



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP

- (21) Patentansøgning nr.: 4320/85
- (22) Indleveringsdag: 24 sep 1985
- (24) Løbedag: 12 feb 1985
- (41) Alm. tilgængelig: 24 sep 1985
- (44) Fremlagt: 25 mar 1991
- (86) International ansøgning nr.: PCT/SE85/00070
- (86) International indleveringsdag: 12 feb 1985
- (85) Videreførelsesdag: 24 sep 1985
- (30) Prioritet: 13 feb 1984 SE 8400752

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> A 61 K 35/48

(71) Ansøger: Lars \*Hellgren; Bronsgjutaregatan 13; S-421 63 Vaestra Froelunda, SE, Erling A. \*Mylius; Ragnhildsgatan 11; N-7000 Trondheim, NO, Jan \*Vincent; Linnegatan 31; S-114 47 Stockholm, SE

(72) Opfinder: SAMME

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Erektions- og frugtbarhedsfremmende middel og fremgangsmåde til dets fremstilling

(56) Fremdragne publikationer

DE pat. nr. 670599  
 FR pat. nr. 2351  
 SE freml. skrift nr. 309648  
 Andre publikationer. Biolgy of Reproduction, vol 3, no 3 (1970) 347-352.

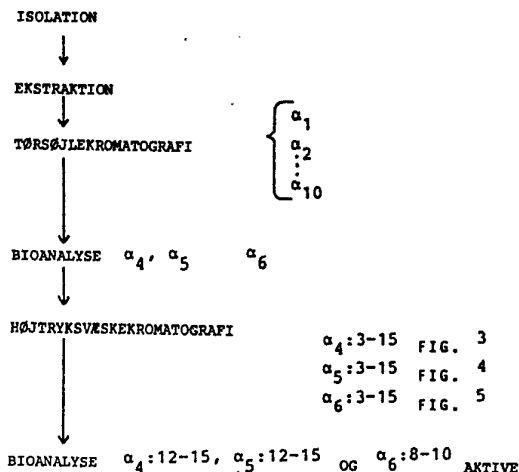
(57) Sammendrag:

4320-85

4320-85

Et erektions- og frugtbarhedsfremmende middel, der som sin aktive bestanddel indeholder de lipidfraktioner, der er vundet fra de cowperske og/eller de bartholinske kirtler og som sammentrækker sandrottetyktarm. Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til fremstilling af midlet og anvendelsen af midlet til fremstilling af erektions- og frugtbarhedsfremmende præparater.

FIG.1



Den foreliggende opfindelse angår et erektions- og fertilitetsfremmende middel samt en fremgangsmåde til fremstilling deraf ud fra de cowperske kirtler og/eller de bartholinske kirtler fra pattedyr indbefattet mennesker.

5

Lipidekstrakter fra mænds og hanpattedyrs cowperske kirtler og kvinders og hunpattedyrs tilsvarende organer, de store vestibulære kirtler betegnet de bartholinske kirtler, i det følgende for nemheds skyld betegnet kirtlerne, har vist sig at have egenskaber, som fører til at man af gode grunde kan forvente, at de vil fremme erektion, ejakulation, spermatozoernes mobilitet og deres evne til at trænge gennem protein og de kvindelige reproduktionsorganer. Midlet kan derfor udgøre en aktiv bestanddel i farmaceutiske præparater med denne indikation.

10

Mænds og hanpattedyrs kirtler betegnes de cowperske kirtler (også bulbo-urethrale kirtler) og består af parvis symmetrisk sammensatte alveolakirtler med fast konsistens, grågul eller svagt brun farve og af en størrelse som en almindelig haveært eller havebønne. Deres udførelsesgang er op til 4 cm i længden og fører ind til urethra umiddelbart ved siden af det sted, hvor urethra fører ind til corpus cavernosum penis.

Kvinders og hunpattedyrs homologe kirtler kaldes de bartholinske kirtler og består af to gråligt gule, runde eller ovale kirtler af størrelsen som en almindelig haveært eller havebønne, og ligger på den dorsale side af vaginaåbningen. Udførelsesgangen har en længde fra 1,5 til 2 cm og udmunder i introitus vagina. De svarer direkte til handyrenes cowperske kirtler. Kirtlernes funktion er ikke fuldt afklaret. Med hensyn til handyrenes cowperkse kirtler er det kendt, at den samlede ekstrakt af sekretet fra disse kirtler koagulerer sædvæsken. På denne måde dannes en slimet klump, hvilket forhindrer, at sædvæsken løber tilbage ved ejakulation. R. G. Hart, The mechanism of Cowper's secretion in coagulating cat semen. J. Reprod. Fert. (1968), 17, 223-226. J. J. Gueze og J. W. Slot, Synthesis and secretion og glycoproteins in rat bulbo-urethral

15

20

25

30

35

(Cowper's) glands, Biology of reproduction 15, 118-125 (1976).

5 Den biologiske virkning af lipidfraktionerne udvundet fra kirtlerne har ikke tidligere været undersøgt. Den foreliggende opdagelse af lipidfraktionernes kraftige virkning på forskellige dele i det urogenitale område er således af stor betydning for bestemmelsen af kirtlernes funktion. Lipidfraktioner udvundet fra disse kirtler, taget fra mænd, kvinder, tyre, orner, væddere, får og køer har været undersøgt, og når de underkastes farmakologiske prøver har de vist sig at have omtrent de samme egenskaber, som dem, der er angivet i det følgende.

15 Der er således nu overraskende i lipidfraktionen fra kirtler vundet fra de ovennævnte arter fundet en faktor, der ses at påvirke både erektion og ejakulation såvel som spermatozoernes mobilitet og deres evne til at trænge gennem protein hos mennesker og dyr. Denne faktor kunne se ud til at være en kraftig peptid-lipid-mægler af prostaglandinlignende/leucotrienlignende type.

25 Opfindelsen angår et erektions- og fertilitetsfremmende middel, der er ejendommeligt ved, at det er fremstillet ud fra de cowperske- og/eller de bartholinske kirtler fra pattedyr, indbefattet mennesker, ved at kirtlerne findeles og ekstraheres, efter at de først eventuelt er befriet fra proteiner, med lipidopløsende middel ved sur pH-værdi, hvorefter vand fjernes, opløsningsmidlet afdampes og remanensen fraktioneres kromatografisk på kendt måde, og at de fraktioner, som sammentrækker sandrottetyktarm, opsamles og eventuelt yderligere renses ved kromatografiske metoder, hvor de opsamlede fraktioner udgør det erektions- og fertilitetsfremmende middel, eventuelt sammen med sædvanlige fortyndingsmidler.

35 Opfindelsen angår endvidere en fremgangsmåde til fremstilling af det erektions- og fertilitetsfremmende middel ud fra de

cowperske- og/eller bartholinske kirtler fra pattedyr indbefattet mennesker, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at kirtlerne findeles og ekstraheres, efter at de først eventuelt er befriet fra proteiner, med lipidopløsende middel ved sur pH-værdi, hvorefter vandet fjernes, opløsningsmidlet afdampes og remanensen fraktioneres kromatografisk på kendt måde, hvorpå de fraktioner, som konstateres at sammentrække sandrottetyktarm opsamles og eventuelt yderligere renses ved kromatografiske metoder.

10

Prostaglandiner og tilsvarende stoffer sammentrækker gerbil colon, dvs. tyktarm fra sandrotte, og derfor anvendes sammentrækning af sandrottetyktarm som et kriterium for sådanne stoffers biologiske aktivitet. Den dermed forbundne prøve gennemføres på følgende måde: Den øvre del af en tyktarm, der er fjernet fra en sandrotte, ophænges i et konventionelt tarmbad, den nedre fastgørelse fastgøres mens den øvre fastgørelse forbindes til en føler, der registrerer sammentrækning og afslapning af tarmen under de forskellige stoffers indflydelse.

20

Da midlerne sammentrækker sandrottetyktarm er der gode grunde til at antage, at de indeholder prostaglandinlignende stoffer. Imidlertid er ingen kendte prostaglandiner eftervist som værende til stede i de lipidfraktioner taget fra kirtlerne, der sammentrækker sandrottetyktarm og som er midlet ifølge opfindelsen (jf. eksemplet og figurerne 2, 3, 4 og 5, hvoraf det vil ses, at det ikke har været muligt at eftervise prostaglandinerne PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGA<sub>2</sub> ved anvendelse af kendt teknik i sådanne lipidfraktioner, der sammentrækker sandrottetyktarm, fra kirtlerne). Sammentrækningerne af sandrottetyktarm kan således anvendes som et kriterium for, at den omhandlede faktor i midlet, der har frugtbarhedsfremmende egenskaber, er til stede i lipidekstrakten fra kirtlerne.

35

Faktoren har positiv ninhydrinreaktion, hvilket viser, at den indeholder aminogrupeer. Prøver under anvendelse af røntgenstrålespredningsanalyse (KEVEX) viser tilstedeværelsen af

svovl (S) i faktoren. Disse to omstændigheder - positiv ninhydrinreaktion og tilstedeværelse af svovl - viser, at der foreligger ligheder mellem faktoren og leucotriener. Imidlertid sammentrækker leucotriener ikke sandrottetyktarm. På den anden side sammentrækker de kraftigt uterusmuskulaturen, hvilket midlet også gør.

Gaskromatografisk og massespektrometrisk analyse viser en kompleks blanding, hvor imidlertid visse fragmenter viser nærværelse af neurotransmitterlignende stoffer med sådan en molekylvægt, at der ved massespektrometrisk analyse ses værdier på mellem 200 og 1000 m/e (dvs. masse/ladning).

NMR (kernemagnetisk resonans) af en fraktion med høj biologisk aktivitet har vist alle prostaglandinlignende stoffers egenskaber, såsom: lang molekylekæde, tilstedeværelse af fedtsyrer og en endestillet  $\text{CH}_3$ -gruppe.

Midlet ifølge opfindelsen er fremstillet ved metoder, der er konventionelle for ekstraktion af prostaglandiner. Kirtlerne kan således først befris fra proteiner, dvs. ved ethanolekstraktion og derefter ekstraheres remanensen ved en sur pH-værdi med diethylether, hvilket opløser lipider. Kirtlerne kan også ekstraheres direkte i et surt miljø, en eller flere gange, med et opløsningsmiddel, og navnlig med et lipidopløsningsmiddel, såsom ethylacetat, isopropanol, methanol, acetone, chloroform og blandinger deraf, såsom chloroform/methanol i rumfangsforholdet 2:1; ethylacetat i blanding med isopropanol, methanol, acetone i varierende rumfangsprocenter med vand, eller de ovennævnte lipidopløsningsmidler, fortrinsvis methanol eller ethylacetat/methanol i rumfangsforholdet 3:1 og med pH indstillet med en puffer til pH 3,5-5, fortrinsvis til 4,5 med 0,1 M kaliumhydrogenphthalat.

Vandet fjernes derpå på en konventionel måde, f.eks. ved frysetørring. Ekstrakten kan også henstilles natten over i køleskab ved en temperatur under  $0^\circ\text{C}$ , og de dannede iskrystaller

filtreres fra ved lave temperaturer under 0°C. Arbejdet udføres hensigtsmæssigt i et nitrogenmiljø for at skærme mod atmosfærisk oxygens oxiderende virkninger. Prøven bliver derpå om ønsket fordampet på et vandbad (40°C), fortrinsvis i en nitrogengasatmosfære. Denne prøve kan anvendes som det erektionsfremmende middel ifølge opfindelsen. Prøven opløses om ønsket i få milliliter af det ovennævnte lipidopløsningsmiddel, fortrinsvis i ethylacetat, og opbevares i et nitrogenmiljø ved -20°C.

10

Prøven kan derefter behandles i overensstemmelse med kendte metoder, der er konventionelle ved separation af prostaglandiner og de fraktioner, der sammentrækker sandrottetyktarm, kan udvindes. Separationen kan f.eks. gennemføres ved kromatografi på silicagel, fortrinsvis ved såkaldt tørkolonnekromatografi under eluering med blandinger af ethylacetat, isooctan, ethanol, vand, eddikesyre, chloroform, isopropanol og myresyre, fortrinsvis med ethylacetat/isooctan/ethanol/eddikesyre/vand (i rumfangsforholdet 35:10:3:0,1:0,1) eller med chloroform/isopropanol/ethanol/myresyre (i rumfangsforholdet 45:5:0,5:0,3). De respektive fraktioner kan derefter elueres ud med blandinger af chloroform og methanol, fortrinsvis i et rumfangsforhold på 1:1.

20

25

Fraktionerne kan også separeres på silicagelplader (TLC) eller ved søjlekromatografi med det samme eller et modificeret opløsningsmiddelsystem. De fraktioner, der sammentrækker sandrottetyktarm udvindes og lagres ved -20°C til yderligere analyse. Disse fraktioner kan anvendes som midlet ifølge opfindelsen, fortrinsvis efter inddampning til tørhed. De kan også renses yderligere ved kromatografi, fortrinsvis efter først at være inddampet til tørhed. Fraktionerne kan derefter renses ved kromatografi, fortrinsvis på silicagel, f.eks. ved højtryksvæskekromatografi under eluering med blandinger af phosphorsyre, acetonitril, methanol, fortrinsvis med phosphorsyre/acetonitril/methanol i forholdet 40:12:48.

30

35

Opfindelsen skal nu beskrives mere detaljeret under henvisning til tegningen, på hvilken

5 fig. 1 illustrerer en foretrukket fremgangsmåde til fremstilling af midlet ifølge eksempel I;

10 fig. 2 viser UV-adsorptionen som funktion af elueringsrumfanget ved højtryksvæskekromatografering af prostaglandinstandarder,

15 Fig. 3 - 5 illustrerer UV-adsorptionen som funktion af elueringsrumfanget ved højtryksvæskekromatografering af henholdsvis fraktionerne  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  og  $\alpha_6$  vundet ved kromatograferingen på "Silica Noelin DCC" i eksempel 1.

20 Eksempler på en foretrukket fremgangsmåde til fremstillingen ifølge opfindelsen er givet i det følgende (jf. også oversigten på fig. 1).

#### Eksempel 1

##### Isolation

25 Faktoren isoleres fra kirtlerne på følgende måde: De cowperske kirtler fjernes fra nyligt afdøde forplantningsdygtige hanner. Kirtlerne fryses derefter øjeblikkeligt ned til en temperatur på  $-20^{\circ}\text{C}$ . De bartholinske kirtler isoleres fra nyligt afdøde forplantningsdygtige hunner, og kirtlerne blev øjeblikkeligt  
30 frosset ned til  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### Ekstraktion

35 Lipidekstrakten blev ekstraheret fra kirtlerne i overensstemmelse med følgende proces: 23,5 g cowperske kirtler og 16,1 g bartholinske kirtler findeltes og homogeniseredes hver for sig med en "Ultraturrax" i henholdsvis 60 ml og 20 ml ethylacetat/

methanol i rumfangsforholdet 3:1. pH indstillede med 0,1 M kaliumhydrogenphthalat til 4,5.

5 Lipidekstrakterne fik lov til at stå natten over i køleskab og vandkrystallerne filtreredes derefter fra ved en temperatur på under 0°C. Derefter koncentreredes prøverne ved inddampning i et vandbad (40°C) i et nitrogenmiljø. Herefter vandtes der 0,43 g fra de cowperske kirtler og 0,15 g fra de bartholinske kirtler. Prøverne lagredes derpå ved en temperatur på -20°C i 10 en nitrogenatmosfære.

#### Separation og rensning

15 Den biologiske faktor separeredes ved hjælp af en modificeret metode til tørøjlekromatografi som på vellykket måde adskil- ler de biologiske aktive lipider fra de øvrige stoffer i eks- trakten. Der blev anvendt en søjle omfattende 10 teflonringe med en højde på 2 cm og en indre diameter på 2,5 cm, tæt pak- ket i et rør. Hver ring svarede til en fraktion, som udstrakte sig mellem to efter hinanden følgende decimale (Rf-)-værdier. 20 Søjlen fyldtes under vibrering med aktiveret silikagel. (Sili- ca Woelm DCC, en særlig silikagel til tør søjlekromatografi (DCC) fremstillet af Woelm AG, Tyskland). Hver af de førnævnte prøver på henholdsvis 0,43 g og 0,15 g indførtes for sig selv i en sådan søjle og elueredes i en opløsningsmiddelblan- 25 ding af chloroform/isopropanol/ethanol/myresyre i rumfangsfor- holdet 45:5:0,5:0,3.

30 Tilførslen af opløsningsmiddel holdtes konstant ved hjælp af udløbet fra en skilletragt anbragt 1-2 cm over prøven. Opløs- ningsmiddelfrontens position op til søjlens bund blev angivet med et første akustisk advarselssignal fremkaldt ved hjælp af en elektrisk føler. Afslutningspunktet blev angivet med et andet signal. En skruehætte på den øverste ende af røret blev 35 derpå fjernet, således at den indvendigt værende delte teflon- kolonne kunne skubbes aksialt opad ved hjælp af et stempel. Teflonringene blev let adskilt fra hinanden, en af gangen,

med hurtige skærende bevægelser. Til sidst blev hver ring monteret i 10 specielt arrangerede teflonsøjler til samtidig eluering. De resulterende fraktioner elueredes med nogle milliliter chloroform/methanol i rumfangsforholdet 1:1 og den biologiske aktivitet afprøvedes på sandrottetyktarm. Fraktionerne 4, 5 og 6 (ringene 4, 5 og 6 talt fra toppen betegnes i det følgende alfa-4, alfa-5 og alfa-6) viste sig at sammentrække sandrottetyktarm og havde de egenskaber, der er vist i forsøg 1-7. Dette gjaldt for begge de førnævnte fraktioner fra henholdsvis de cowperske og de bartholinske kirtler. Fraktionerne inddampedes til tørhed inden for et nitrogengasmiljø på et vandbad (40°C) og rensedes ifølge det følgende, selv om dette rensningstrin er valgfrit.

#### 15 Højtryksvæskekromatografi - (HPLC)-analyse

Fraktionerne alfa-4, alfa-5 og alfa-6 isoleret fra de respektive kirtler analyseredes ved højtryksvæskekromatografi, der her betegnes som HPLC. Separation gennemførtes på en højtryks 5 µm omvendt-fase-kolonne. Der anvendtes et system omfattende en "Consta Metric - III-HPLC-pumpe" (Lab. Data Control) og en "Consta Metric Spectromonitor III" (LDC) variabel bølglængdedetektor. Detektoren kobledes til en "Rec-2-recorder" (Pharmacia) og en integrator (HP 3888 A). Kolonnesystemet omfattede en 49 x 4,6 mm LD forkolonne pakket med 40 µm partikkelformet omvendt-fasemateriale ("Pelliguar LC-18") og en 250 x 4,6 LD, "Supelco-sil LC-18" analysekolonne pakket med 5 µm kugleformede partikler.

30 Prostaglandiner elueret fra HPLC-systemet påvistes ved adsorption i ultraviolet lys. Uderivatiserede prostaglandiner påvistes ved 199,5 nm. De fra henholdsvis de cowperske kirtler og de bartholinske kirtler ved tørsøjlekromatografi vundne og til tørhed inddampede fraktioner alfa-4, 35 alfa-5 og alfa-6 opløstes hver i 2 ml absolut ethanol.

Fra hver af disse 2 ml prøver blev der udtaget 20  $\mu$ l. Af de cowperske og bartholinske kirtler blev 5 sådanne 20  $\mu$ l prøver behandlet i kolonnen for hver af fraktionerne alfa-4, alfa-5 og alfa-6. Et trekomponent-elueringsmiddel omfattende phosphorsyre (0,1 M), acetonitril og methanol i forholdet 40:12:48 anvendes til at adskille fraktionerne på kolonnen. Prøver blev derpå udtaget systematisk fra kolonnen og analyseret med hensyn til sammentrækning af sandrottetyktarm. Fraktionerne med retentionstider (RT) 3-6 og 12-15 fra fraktion alfa-4, fraktionerne med retentionstid 3-6 og 12-15 fra alfa-5 og dem med retentionstid 8-10 fra alfa-6 sås ifølge observationer af sammentrække sandrottetyktarm. Dette gælder for alfa-4, alfa-5 og alfa-6 fra såvel de cowperske som de bartholinske kirtler.

Da der blev foretaget sammenligning med et antal prostaglandinstandarder, såsom  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$  og  $\text{PGE}_1$  og også  $\text{PGF}_{2\alpha}$  og  $\text{PGA}_2$  kunne ingen af disse prostaglandiner iagttages i blandingen (jf. fig. 2, der illustrerer UV-adsorption ved 199,5 nm som funktion af elueringsrumfang og retentionstid ved HPLC af disse standarder, med figurerne 3, 4 og 5, der viser den samme kurve for fraktionerne  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ , og  $\alpha_6$  fra DCC.). Den biologiske aktivitet viste sig imidlertid at være kompleks, når fraktioneringen gennemførtes med HPLC. Den primære biologiske aktivitet fandtes i HPLC-fraktioner alfa-4:12-15, alfa-5:12-15 og alfa-6:8-10.

#### Gaskromatografisk-massespektrometrisk-analyse

Denne analyse viste en kompleks blanding, hvor imidlertid visse fragmenter blev iagttaget, som viser nærværelse af neurotransmitterlignende stoffer med en molekylvægt på mellem 200-1000 m/e (alfa-6:8-10).

#### NMR-analyse

NMR (kernemagnetisk resonans) anvendes til at undersøge fraktion alfa-5:12-15, der er en fraktion med høj biologisk aktivitet. Den viste alle prostaglandinlignende stof-

fers egenskaber, såsom en lang kæde, nærværelsen af fedtsyrer og terminal  $\text{CH}_3$ -gruppe.

#### Eksempel 2

5

10

50 g cowperske kirtler taget fra afdøde mænd homogeniseredes med 50 ml methanol i "Ultraturax". pH indstilledes til 4,5 med 0,1 M kaliumhydrogenphosphat. Ekstrakten henstod natten over i køleskab, hvorefter iskrystaller filtreredes fra ved en temperatur på under  $0^\circ\text{C}$ . Derefter koncentreredes prøven ved inddampning til tørhed i en nitrogenatmosfære på et vandbad.

15

Nedenfor er angivet et antal forsøg, der belyser den biologiske virkning af faktoren i midlet ifølge opfindelsen.

#### Forsøg 1

20

Faktorens virkning på muskel-collagen-trabikuler i menneskers og dyrs (tyr) corpora cavernosa samt virkning på penisarteriers glatte muskler.

25

30

35

Erektionen af penis hos mænd og hanpattedyr skyldes en overfyldning af erektilvævene i penis, dvs. corpora cavernosa (svulmelegemer). Disse indeholder et svampelignende væv, der omfatter collagenvævbundter og glatmuskulaturfilamenter, som danner et omfattende net, det såkaldte trabecula corpora cavernosa. De dannede hulrum kan hurtigt udvides og trækkes sammen, dvs. fyldes og tømmes for blod. Ved en erektion afspændes den glatte muskulatur i corpora cavernosa. Desuden forsyner arterierne corpora cavernosa med blod, dvs. penisarterierne udvides. Erektion af penis afsluttes, dvs. penis afslappes på en tilsvarende måde ved en tilsvarende sammentrækning af muskelfilamenterne i corpora cavernosa og penisarterierne.

#### Præparering:

Et antal handyr blev aflivet og hele penis blev fra hver fjernet og transporteret til laboratoriet i en puffer-

opløsning (Krebs's opløsning) ved en temperatur på +4°C. Dele af corpora cavernosa fra væddere blev fjernet på en lignende måde. Lange strimler målende ca. 1,5 cm i længden og 4 cm i bredden blev skåret ud fra den centrale del af muskulaturen i trabecula-netværket. På lignende måde blev en strimmel med længden 1,5 cm og en bredde på ca. 3 mm udskåret fra penisarteriens muskulatur. Dissektionen blev tilendebragt inden for 1-2 timer efter aflivningen af dyret. Strimlerne holdtes i Krebs-opløsningen i højst 1 kalenderdag og fremviste intet aktivitetstab i løbet af denne periode.

Bioanalyse: Virkningen af faktoren på isolerede muskelfilamenter undersøgtes ved hjælp af en "Grass Force Displacement Transducer" koblet til en "Grass-polygraph". PGE<sub>2</sub> og PGF<sub>2α</sub> anvendtes som standarder under disse forsøg. Ved at undgå for kraftig tension i fastgørelsesorganerne i det biologiske prøvningssystem var det muligt at opretholde spontan motilitet i vævet. Faktoren vundet fra cowperske kirtler dryppedes på de isolerede muskelfibre, hvorved der således vandtes en klar afslapning af musklerne ved trabecula-netværket fra penis. Den samme reaktion - omend svagere - vandtes med fraktionen udvundet fra de bartholinske kirtler. PGE<sub>2</sub> i en koncentration på 50 ng/ml gav en lignende virkning, selv om den var yderst svag, mens PGF<sub>2α</sub> i tilsvarende koncentration i stedet gav en forøget muskeltonus.

Faktoren fra de cowperske kirtler dryppedes på den i den biologiske analysesystem nedhængte penisarterie på en måde, ligesom for de ovennævnte muskelfibre. Der blev iagttaget en klar afslapning af muskulaturen, når faktoren dryppedes på penisarterien. På den anden side gav PGF<sub>2α</sub>, koncentration 50 ng/ml, og PGE<sub>2</sub> i den samme koncentration en kraftig sammentrækning af penisarterien. Dette synes klart at vise, at mens de anvendte to typer prostaglandiner primært modvirker erektion, fremmer lipidfraktionerne vundet fra kirtlerne erektionen i kraftigt omfang.

Forsøg 2

Faktoren vundet fra kirtlerne sammentrækker urethra-muskulaturen hos mænd og hanpattedyr. Urethra omfatter en slimhindekanal, hvoraf størstedelen er omsluttet af et lag muskler med en indre i længderetningen udstrakt muskulatur og ydre tværgående lag. Det er bedst udviklet i den bageste del af urethra. I den forreste del af urethra findes der skråt forløbende muskelbundter. Når der arbejdes med prostata fra det hanlige genitalsystem, fjernes der fra urethra inden for prostatasektionen en del af urethra, som præpareres og opbevares i en Krebs-puffer. Ved den bioanalytiske prøve blev de præparerede muskelstrimler monteret i det ovenfor beskrevne bioanalysesystem med ekstrem følsomhed. En blanding af O<sub>2</sub> (95%) og CO<sub>2</sub> (5%) ved 37°C sættes til organbadet. Faktoren vundet fra de cowperske kirtler dryppedes på muskelstrimlerne, hvorpå der blev iagttaget en udtalt sammentrækning af urethramuskulaturen. Den samme virkning, skønt mindre udtalt, blev opnået med faktoren vundet fra de bartholinske kirtler. Begge faktorerne var ekstraheret fra menneskekirtler. Resultaterne er siden blevet bekræftet med tyreurethra; PGF<sub>2α</sub> gav en lignende sammentrækning af urethramuskulatur, mens PGE<sub>2</sub> afslappede muskulaturen. Sammentrækning af urethra muskulaturen, når den udsættes for faktoren må fremme ejakulationsprocessen. Det er rigtigt, at denne metode til at måle denne funktion er indirekte, men for tiden findes der ingen metoder, hvor funktionen kan måles direkte på mennesker.

Forsøg 3

Faktoren fremmer spermatozoernes motilitet (bevægelighed). Det er kendt, at prostaglandiner af type E ikke har nogen virkning på spermatozoernes bevægelighed. Prostaglandin F<sub>2α</sub> har muligvis en retarderende virkning på spermatozoers motilitet. Der er foretaget prøver til undersøgelse af faktoren, hvor spermatozoernes motilitet blev undersøgt under et mikroskop. Ved disse forsøg blev henholdsvis de bartholinske og de cowperske kirtler opløst i saltvand og sat til en opløsning indeholdende aktive spermatozoer.

0

Det kunne vises, at faktoren vundet fra de bartholinske kirtler skabte en særligt aktiv forstærkning af spermatozoernes bevægelighed. Faktoren vundet fra de cowperske kirtler gav en lignende, men mindre udtalt virkning ved den samme koncentration. Saltvandet havde ingen virkning. Spermatozoerne fra mennesker, får og tyre tømmes ved ejakulation ind i vagina og er styret til at nå ægcellen ved hjælp af deres egen bevægelighed. Der er således gode grunde til at antage, at faktoren letter den aktive vandring af spermatozoerne gennem vagina og livmoderhulen.

10

#### Forsøg 4

15

Faktoren fremmer spermatozoernes gennemtrængning gennem frisk æggehvide. Et hønseæg blev knust og æggehviden blev anbragt på et objektglas til et mikroskop. Derpå indførtes et kapillarrør i æggehviden og æggehviden blev udtrukket. En spermatozoprøve blev anbragt på hver af to urglas, det ene med faktoren tilført dertil og det andet uden faktor. Ved de respektive prøveprocedurer anvendtes faktoren vundet fra både de bartholinske kirtler og de cowperske kirtler fra mennesker. Reagensglassene, der indeholdt æggehvide, blev anbragt i spermatozoprøverne og fikseret med syntetisk modelervoks (modeleringsler). Kapillarrørene blev anbragt lodret, og urglassene, med capillarrørene placeret derpå, blev derpå anbragt i et varmeskab. Spermatozoernes evne til at vandre gennem æggehviden undersøgte derpå under et mikroskop med et tidsmellemrum på 60, 120 og 180 minutter. Det kunne tydeligt ses, at faktoren vundet fra de bartholinske kirtler signifikant øgede spermatozoernes evne til at passere gennem æggehvide; faktoren vundet fra de cowperske kirtler havde en lignende, men svagere virkning.

30

35

Spermatozoernes evne til at trænge gennem proteinet i ægcellerne er af største betydning med hensyn til befrugtning.

0

Forsøg 5

Faktoren koagulerer sædvæske (den væske, hvori spermatozoer er suspenderet). Fibrinolytiske enzymer i sædvæsken giver  
5 fuldstændig eller partiel flydendegørelse af koagulerede spermatozoer. Det er kendt, at den samlede ekstrakt af sekretet fra de cowperske kirtler vundet fra tyre og fra væddere koagulerer sædvæske. Udtrykt funktionelt danner flydende sædvæske en koaguleringsklump, som udgør et vigtigt træk ved ejakulationsprocessen. Det forhindrer også tilbageløb af sædvæske  
10 under ejakulationsfasen og fremmer således dyrenes frugtbarhed og er især fremmende hos væddere.

Faktorens evne til at koagulere spermatozoer belyses ved hjælp  
15 af følgende: 0,5 ml flydendegjorte spermatozoer ( i en let flydedygtig tilstand) indførtes i et reagensglas ved 37°C. 0,5 ml af faktoren (vundet fra de cowperske kirtler) opløstes i saltvand og sættes til de flydende spermatozoer. Spermatozoerne viste sig at koagulere hurtigt til  
20 dannelse af en fast koagulat. Dette koagulat sås at vende tilbage til den flydende form efter ca. 10 minutter. Til sætning af faktoren vundet fra de bartholinske kirtler gav en lignende, men svagere koagulation.

25 Forsøg 6

Faktoren sammentrækker den glatte muskulatur i det uterotubale forbindelsespunkt hos kvinder (UTJ). Når faktoren anbringes på glat muskulatur fra UTJ opnås en sammensat reaktion.  
30 Dette skyldes, at det kvindelige uterotubale forbindelsespunkt indeholder tre forskellige muskellag, som giver en specifik reaktion på lipide mæglere inden for prostaglandinfamilien. Muskelvæv isoleredes fra UTJ taget fra sunde forplantningsdygtige kvinder, der var underkastet sterilisation eller hysterektomi. Cirkulære og langsgående muskelfilamenter indførtes i en bioanalyseenhed med en Krebs bicar-

35

bonatpuffer. På normal måde tilsattes en blanding af oxygen og carbondioxid og prøverne gennemførtes ved en temperatur på 37°C. Faktoren viste sig at skabe sammentrækning af længdemuskulaturen og svækkelse af den cirkulære muskulatur.

#### Forsøg 7

Faktoren sammentrækker vaginalmuskulaturen. Glat muskulatur isoleret fra køers vaginalvægge arrangeredes i den bioanalytiske enhed. Faktoren vundet fra de cowperske kirtler ekstraheret fra tyre fremkaldte en udtalt sammentrækning af muskelstrimler. Det er velkendt, at penisarterierne er udvidet ved erektion, at der tilføres mere blod til corpora cavernosa, som derved fyldes og en erektion finder sted.

Ved ejakulationsprocessen trækkes muskulaturen omkring urethra sammen i flere autonome sammentrækninger og udsender sæden fra penis med højt tryk. De spermatozoer, der er til stede i den ejakulerede sæd afsættes i vagina, og bevæger sig enten ved hjælp af aktiv mobilitet eller passiv vandring til livmoderhulen, hvorfra spermatozoerne vandrer yderligere for at nå ægcellen, med efterfølgende indtrængning deri.

#### Forsøg 8 - erektionsprøve

Aber (marekatte) fra 3 til 4 år gamle og vejende 4,5-5,0 kg blev bragt til at sove med "Ketalar"® (et hurtigt virkende anæstetisk middel, der indeholder ketaminhydrochlorid i en mængde på 50 mg/ml, og som leveres af Park-Davis, USA) i en dosis på 1,8 ml + eventuelt yderligere 0,5 ml. De respektive abers penis blev holdt tilbage ved hjælp af et aflangt sugesapparat.

Følgende stoffer indsprøjtedes gennem tunica albuginea i corp carvarnosum (glat muskulatur) ved hjælp af sprøjte med 26 G spids, den indsprøjtede opløsning havde en temperatur på 30°C. 1. 0,5 ml fysiologisk natriumchlorid (NaCl), hvilket ikke gav nogen reaktion;

0

2. 0,5 ml (15 mg) papaverin, som fremhjælp en erektion på få minutter; erektionen opretholdtes i 1-2 timer;
3. 0,5 ml (2 mg) phenoxybenzamin, som gav samme reaktion som papaverin, måske med længere varighed;
- 5 4. Et frysetørret stof vundet ifølge eksempel 2 opløstes i 0,5 ml fysiologisk NaCl efter blæsning i nitrogen. 3 aber blev afprøvet. Der blev iattaget erektion og denne varede i 2-4 timer for 2 dyr og op til 24 timer for 1 dyr.

10

Det har været muligt at vise, at faktoren vundet fra kirtlerne fra mennesker og pattedyr (de cowperske og de bartholinske kirtler) klart fremmer såvel erektion og ejakulation og befrugtning af ægcellen ved:

15

- udvidelse af muskulaturen i corpora cavernosa i penis;
- udvidelse af penisarteriens muskulatur;
- sammentrækning af urethramuskulaturen;
- sammentrækning af vaginalmuskulaturen;
- sammentrækning af de langsgående bundter i det uterotubale forbindelsessted (forbindelsen mellem livmoder og ægleder);
- 20 - forstærkning af spermatozoernes aktive bevægelighed;
- forøgelse af spermatozoernes evne til at trænge gennem æggehvide (protein); og
- koagulering af sædvæske.

25

Taget sammen med den kendte kendsgerning, at ekstrakten fra kirtlerne tjener til at smøre den urogenitale slimhinde er der herved opnået en indikation for, at faktoren har en virkelig betydning til fremme af erektion, ejakulation og spermatozoernes mobilitet og deres evne til at trænge gennem protein. Faktoren kan således anvendes som et frugtbarheds-

30 fremmende stof.

35

Den måde, hvorpå faktoren udøver sin virkning på en situation in vivo kan illustreres ved at gå ud fra ansøgenes pionerarbejde med elektronmikroskopundersøgelser af kirtlerne, især de cowperske kirtler (L. Hellgren, E. Mylius og J. Vincent;

0

The ultra-structure of the human bulbo-urethral gland.

J. Submicroscop. Cytol 14 (4), 683-689, 1982). Faktoren kan opfattes som havende enten en direkte eller en indirekte virkning eller en kombination af begge dele. Den direkte virkning kan opfattes som virkende på spermatozoerne i overensstemmelse med forsøgene 1-7. Faktorens indirekte ("hormonale") virkning på muskulaturen i penisarterien, vagina, urethra og æggeleder eller de fallopiske rør kan opnås ved blodcirkulation. At det sandsynligvis forholder sig på denne måde underbygges af ansøgenes elektronmikroskopiske opdagelse af små sekretionskorn, som er til stede i kirtlernes blodkar i de cowperske og bartholinske kirtler, idet indholdet af de små korn sandsynligvis udtømmes direkte i blodkredsløbet.

15

Faktoren kan anvendes som et frugtbarhedsfremmende og erektionsfremmende middel. Disse midler kan bestå af de lipidfraktioner fra de cowperske og bartholinske kirtler, som vil sammentrække sandrottetyktarm, f.eks. den første urene samlede lipidekstrakt og navnlig de aktive fraktioner elueret ved tørstøjlekromatografi og højtryksvæskekromatografi i eksempel 1. Midlerne kan også være til stede i præparater sammen med konventionelle fortyndingsmidler. Præparaterne kan være i form af en injicerbare væsker, sprøjtepræparater, tabletter, suspensioner, opløsninger, sirupper, suppositorier og kapsler. Prøveopløsningerne inddampes fortrinsvis til tørhed og opløses i fysiologisk kogsalt og indsprøjtes.

30

35

## P a t e n t k r a v .

-----

1. Erektions- og frugtbarhedsfremmende middel, k e n d e t  
5 t e g n e t ved, at det er fremstillet ud fra de cowperske-  
og/eller de bartholinske kirtler fra pattedyr, indbefattet  
mennesker, ved at kirtlerne findeles og ekstraheres, efter at  
de først eventuelt er befriet fra proteiner, med lipidopløsen-  
10 de middel ved sur pH-værdi, hvorefter vand fjernes, opløs-  
ningsmidlet afdampes og remanensen fraktioneres kromatografisk  
på kendt måde, og at de fraktioner, som sammentrækker sandrot-  
tetyktarm, opsamles og eventuelt yderligere renses ved kroma-  
tografiske metoder, hvor de opsamlede fraktioner udgør det  
erektions- og fertilitetsfremmende middel, eventuelt sammen  
15 med sædvanlige fortyndingsmidler.

2. Fremgangsmåde til fremstilling af et erektions- og frugt-  
barhedsfremmende middel ifølge krav 1 ud fra de cowperske- og/  
20 eller de bartholinske kirtler fra pattedyr indbefattet menne-  
sker, k e n d e t e g n e t ved, at kirtlerne findeles og  
ekstraheres, efter at de først eventuelt er befriet fra prote-  
iner, med lipidopløsende middel ved sur pH-værdi, hvorefter  
vandet fjernes, opløsningsmidlet afdampes og remanensen frak-  
tioneres kromatografisk på kendt måde, hvorpå de fraktioner,  
25 som konstateres at sammentrække sandrottetyktarm opsamles og  
eventuelt yderligere renses ved kromatografiske metoder.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at  
ekstraktionen med lipidopløsende middel gennemføres med ethyl-  
30 acetat, isopropanol, methanol, acetone, acetone/vand-blandin-  
ger, chloroform eller blandinger deraf.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at  
den kromatografiske fraktionering gennemføres på silikagel un-  
35 der anvendelse af ethylacetat, isooctan, ethanol, eddikesyre  
og vand i rumfangsforholdet 35:10:3:0,1:0,1, eller chloroform,  
isopropanol, ethanol og myresyre i rumfangsforholdet 45:5:0,5:  
0,3, som elueringsmiddel.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 2, kendet ved, at den yderligere rensning gennemføres ved højtryksvæskrokromatografi (HPLC) med en blanding af phosphorsyre, acetonitril og methanol i rumfangsforholdet 40:12:48 som elueringsmiddel.

5

10

15

20

25

30

35

FIG.1

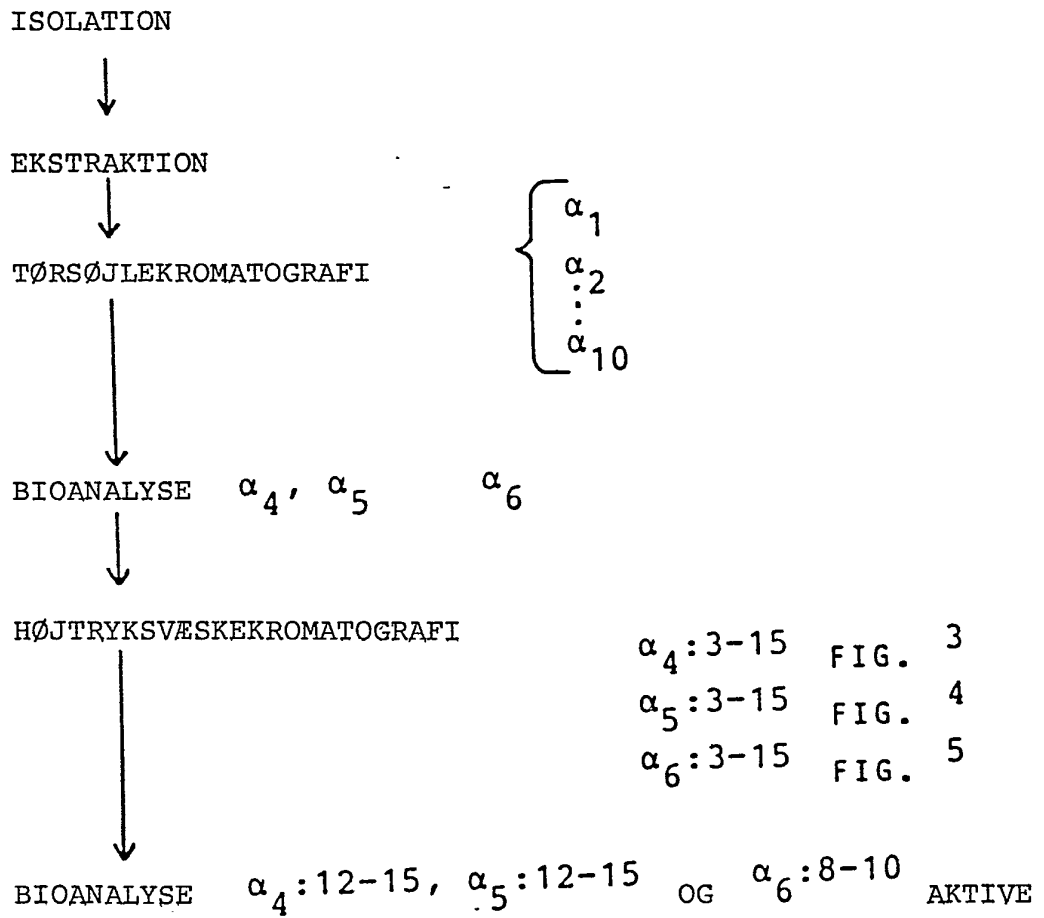


FIG.2

PROSTAGLANDINSTANDARDER

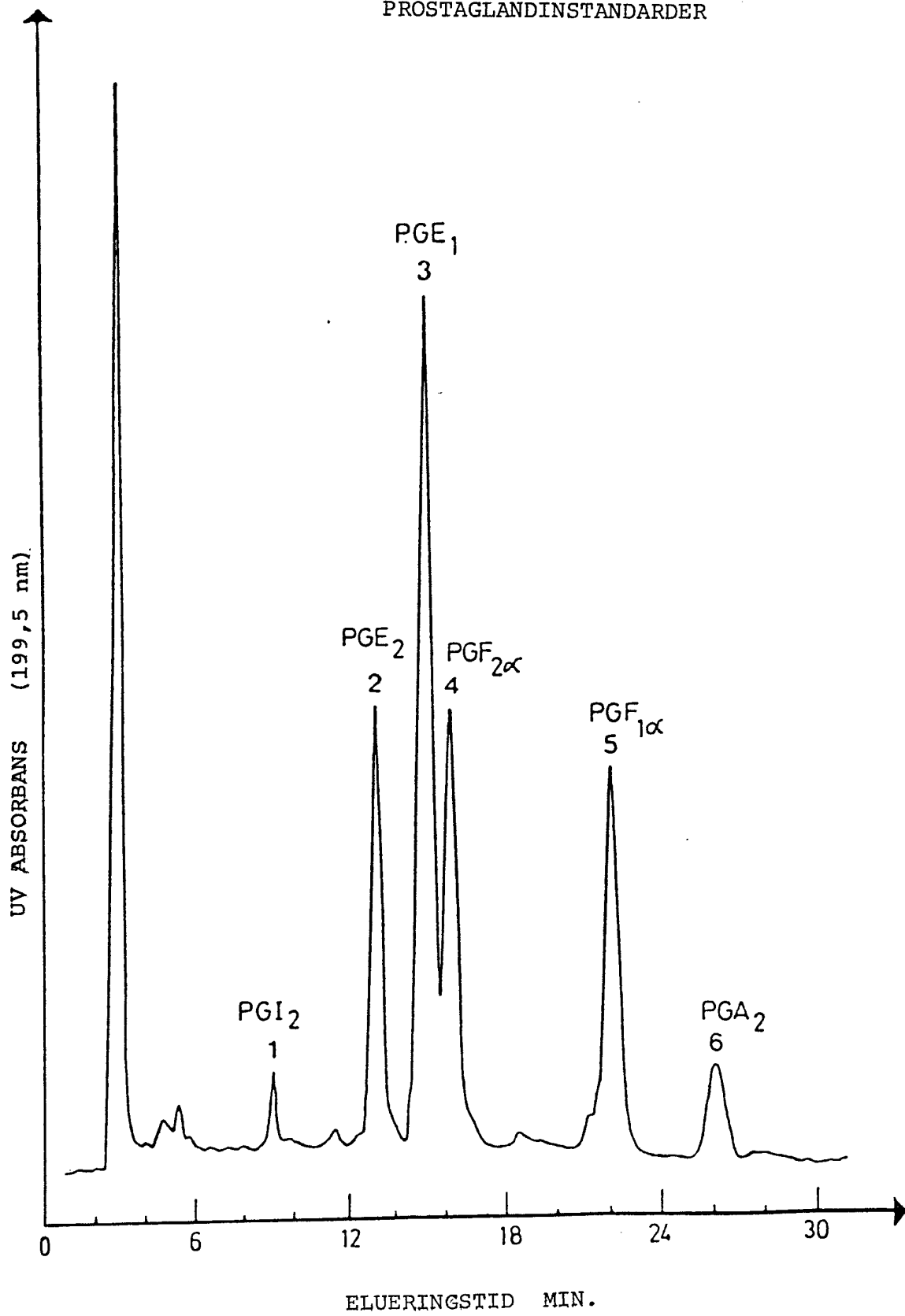


FIG. 3

$\alpha_4$ : 3-15

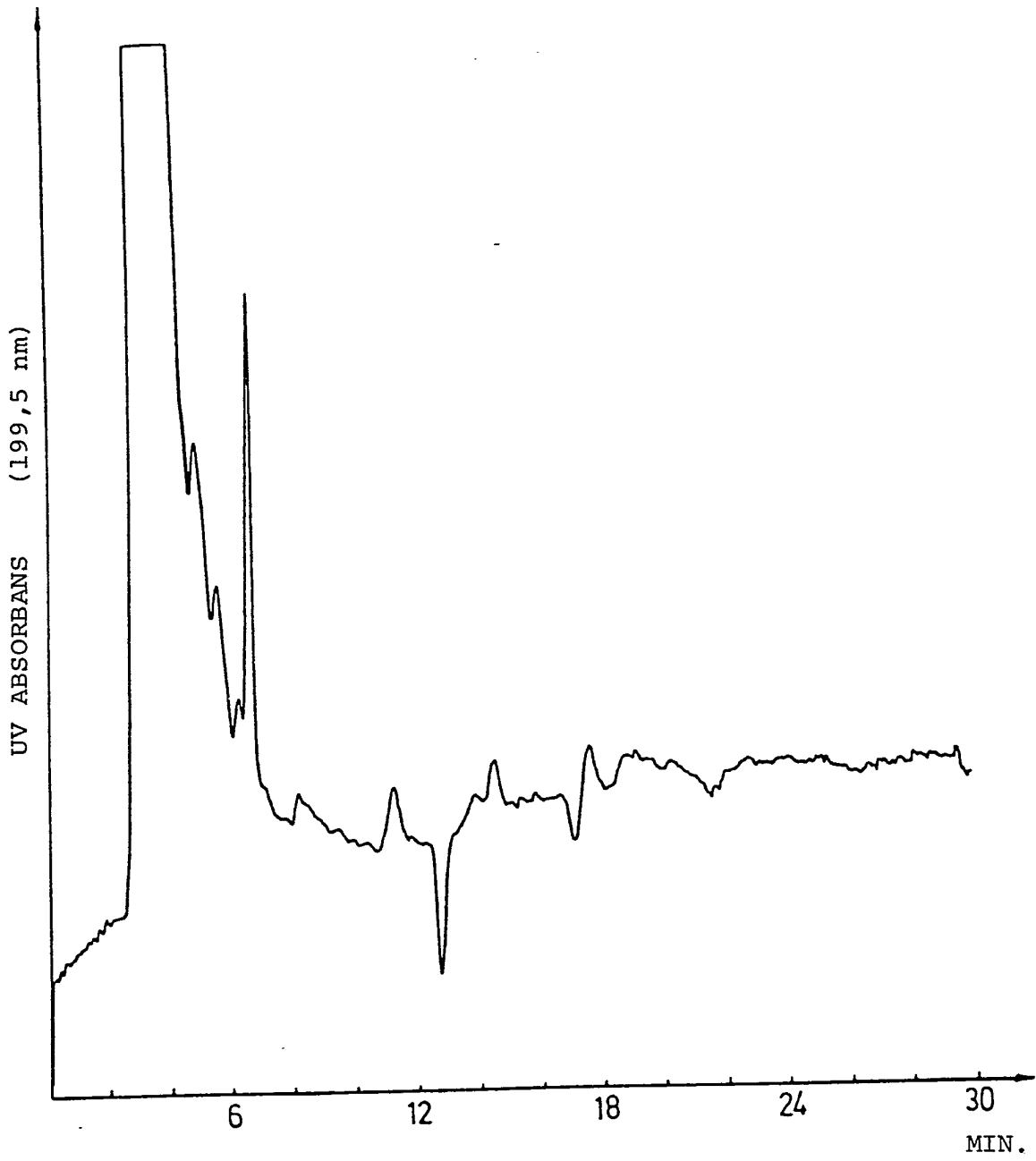
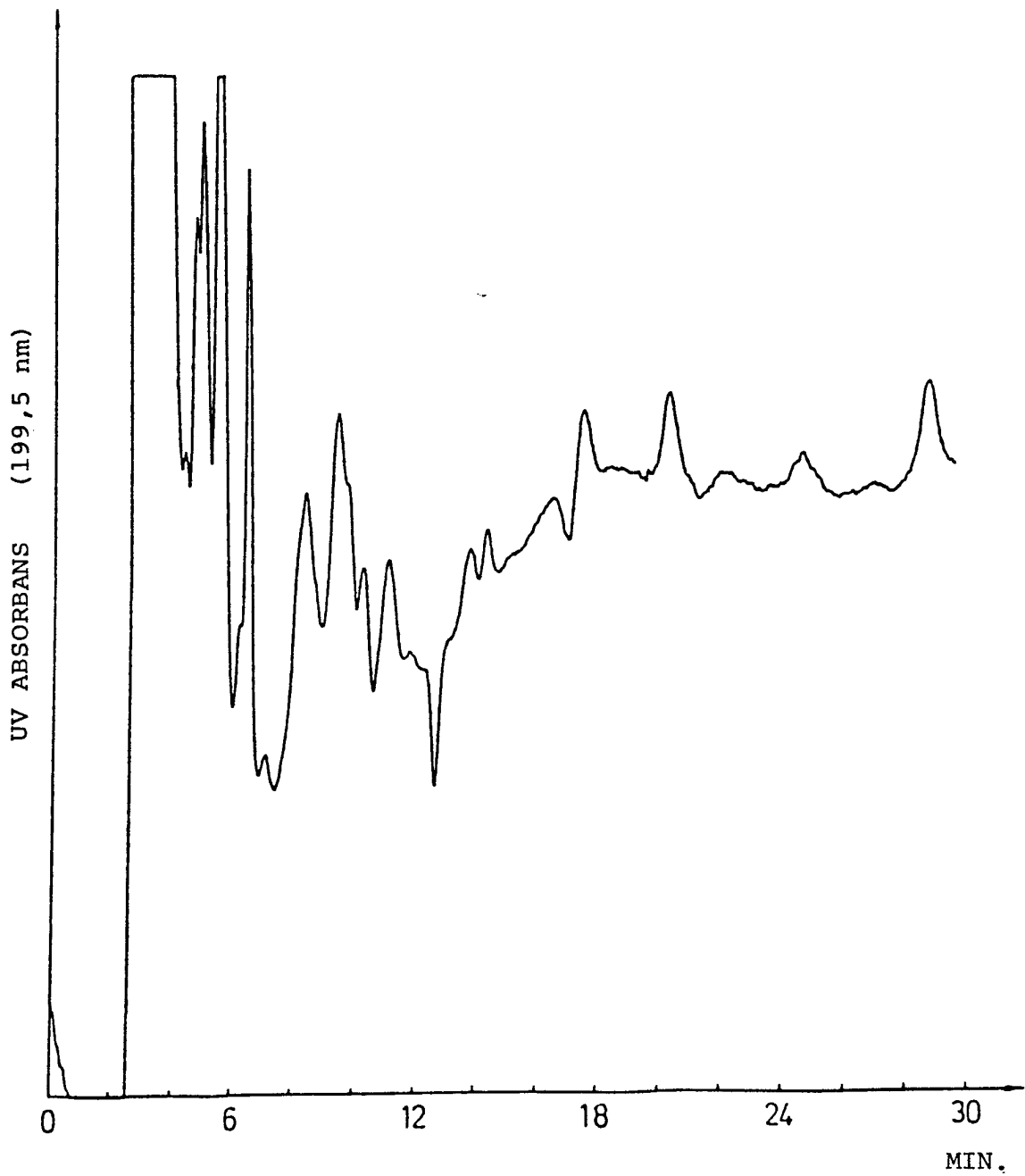


FIG.4

$\alpha_5$ : 3-15



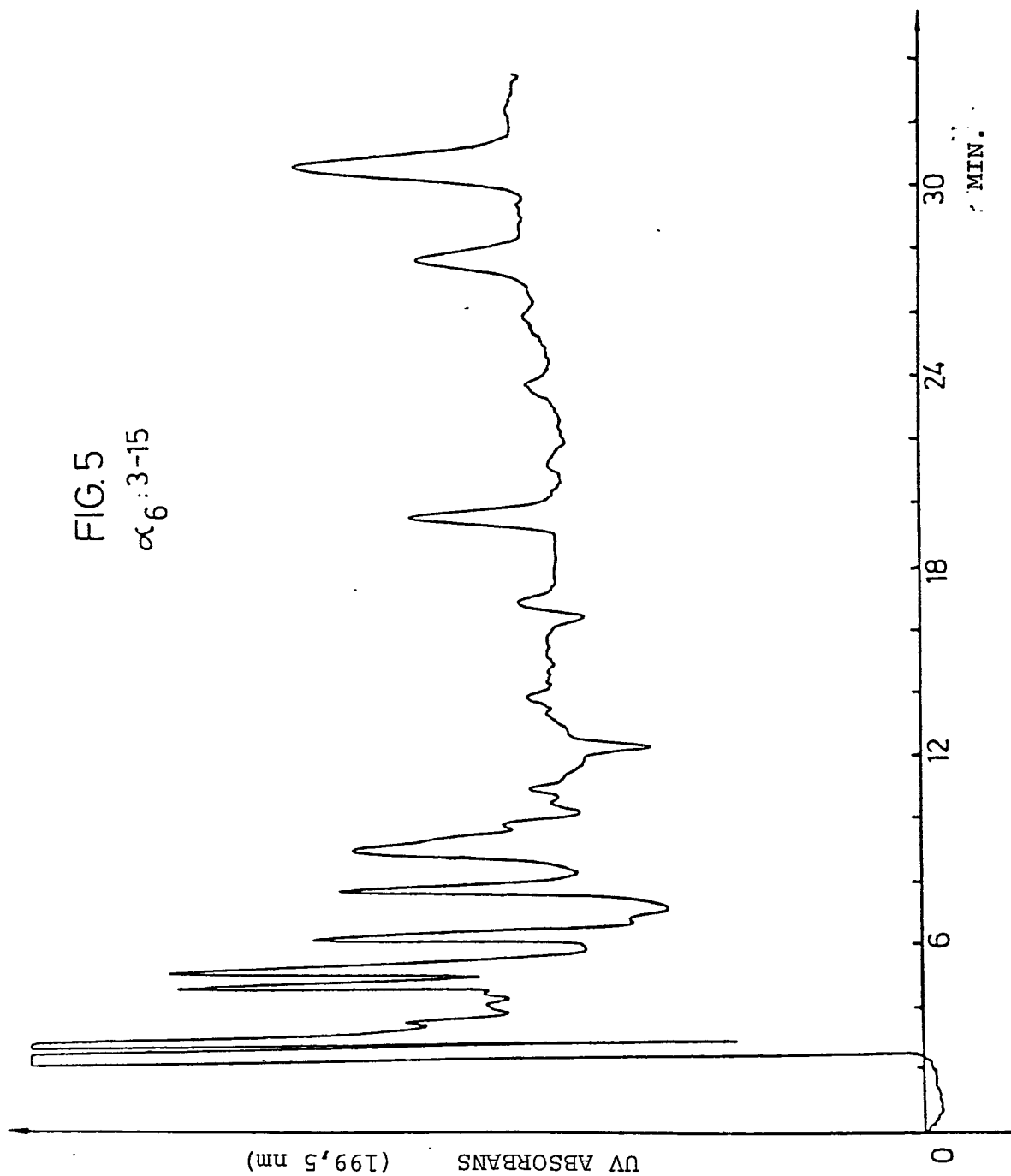


FIG. 5  
 $\alpha_6$ : 3-15