



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 87108176.8

[51]Int.Cl⁶

[45]授权公告日 1996 年 9 月 18 日

A61K 31 / 565

[24]颁证日 96.6.22

[21]申请号 87108176.8

[22]申请日 87.12.18

[30]优先权

[32]86.12.22[33]US[31]06 / 945,114

[73]专利权人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72]发明人 杰克·弗雷德里克·瓦格纳

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

A61K 38 / 25

代理人 杨九昌

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 协同处理法

[57]摘要

通过同时施用雌激素和生长激素释放因子的方法
增加经济哺乳动物血流中内源性生长激素的浓度。

权 利 要 求 书

1. 一种增加牛、猪或羊的血流中内源性生长激素浓度的方法，该方法包括同时施用协同有效量的雌酮、雌二醇或玉米赤霉醇或者它们的一种酯衍生物和生长激素释放因子。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中在所施用的对象—牛、猪或羊中，所施用的对象是牛。

3. 根据权利要求 2 的方法，其中所说的牛是乳牛。

4. 根据权利要求 2 的方法，其中生长激素释放因子是牛生长激素释放因子。

5. 根据上述权利要求中的任何一个权利要求的方法，其中在所说的有效量的雌酮、雌二醇或玉米赤霉醇或者它们的一种酯衍生物中，所施用的是雌二醇或其 C_1-C_6 链烷酸酯或其苯甲酸酯。

6. 根据权利要求 1 的方法，其中所施用的对象是猪，而生长激素释放因子是猪生长激素释放因子。

协同处理法

本发明属于动物饲养和生物化学领域，并且提供了增加经济哺乳动物血流中内源性生长激素浓度的改进方法。

在肽化学和在所有生命形式中的蛋白质激素的作用研究中近代急速发展的一个重要部分是对生长激素的研究。对各种动物产生生长激素的研究表明：在所有研究过的各种动物中，相对小的肽（称为生长激素释放因子）对生长激素的产生和分泌起着主导作用。有趣的是，在其内源性生长激素释放因子的氨基酸排列顺序已弄清楚的所有物种中，其内源性生长激素释放因子（GRF）是一种非常相似的肽。在所有已知物种中它是43和44氨基酸的肽，而且除了大鼠以外，在所有的已知物种中，这种肽的末端都是酰胺化了的。在各种内源性生长激素释放因子中，氨基酸顺序是十分相似的；实际上牛GRF 和山羊GRF 是相同的。

在本文中，使用了下列术语。术语“生长激素释放因子”（GRF）用来泛指任何具有增加经济哺乳动物产生并释放生长激素作用的任何肽。术语“内源性GRF”是用来表示动物本身自然产生的GRF。就合成和重组生产的GRF而言，应用一个首字母来表示已复制出其GRF的物种，例如“h”表示人。“b”表示牛等等。当GRF是酸的形式时，实际上所说的，则是酰胺化了的酸。术语“相似物”用来表示起GRF作用的肽，但是其氨基酸数目少于内源性GRF，或排列顺序不同。合成的GRF其氨基酸含量少于内源性GRF的可用数字表示；例如“hGRF29”表示一种由人内源性GRF的开头29个氨基酸组成的GRF。

目前完全确定了提高经济哺乳动物中生长激素水平的效益。最引人

注目的已知效益是当生长激素增加时，乳牛的牛奶产量增加。在文献中已经报导了，由于提高了猪和羊的生长激素水平，猪和羊的生长率和饲料转化率均得到了改善。在牛方面尚未报导过具有相同效益的作用，不过必须识认到生长激素和GRF 仍然是稀少而昂贵的，而且据认为尚来完成用二者之中的任何一个来做的饲养试验。几年来由于直接施用生长激素已使不正常小的小孩的生长率增加，但是由于难以得到生长激素，故费用昂贵。而且对于在经济哺乳动物中，对生长激素的应用还没有类似量的研究工作。

当然，最广泛研究的GRF 是人类。人们发现可以彻底改进人类内源性的GRF 肽，而没有破坏增加生长激素的产生和分泌的效能。现已制备了含23至40个氨基酸的人类GRF 的相似物，一种是酰胺末端，另一种是酸式末端。并且发现这些相似物是活性的。而且，在内源性肽中作了各种变化，例如组氨酸，3-甲基组氨酸或N-乙酰酪氨酸替换在肽的1-位上的酪氨酸。这些物质也是有效的。

鉴于不同物种的内源性GRF 的相似性，所以不同物种一般是交叉有效的物种，关于这一点，也许并不感到意外。例如，在Domestic Animal Endocrinology 2 133-39(1985)中Kraft 等人指出，内源性人类GRF 和人类GRF 相似物〔该相似物具有40种氨基酸和一种游离酸末端(hGRF40 酸)〕在鼠、Rhesus猴子、兔、羊、牛、鸡和人中都有活性。

有一篇文献对GRF 以及GRF 与生长激素产生和分泌之间的关系做了广泛的描述。它以综述的形式提到了下面的文章，并已载入该文献。

<u>Ann.Rev.Biochem.</u> 54	403-23(1985)Ling 等人
<u>Neuroendocrinology</u> 42	273-76(1986)Baird等人
<u>Fed.Proc.</u> 45	280(1986)Kensinger 等人
<u>Endocrinology</u> 114	1613-16(1984)Wehrenberg等人

已发现在许多情况下，对动物施用雌性激素也可增加内源性生长激

素的浓度。例如，Frantz等人发现，在达到病人禁食的条件下，对正常人施用大剂量的二乙基己烯雌酚提高了生长激素的浓度(J.Clin. Endocr. 25 1470-80(1965))。Trenkle 在用普通精饲料和外加10毫克己烯雌酚 / 头 / 天喂养的小公牛身上观察到生长激素增加 (J.An.Sci 31 389-93(1970))。

Wiedemann 等人给正常人以静脉注入乙炔基雌二醇或“结合雌激素”(J.Clin Endocr. and Metab. 42, 942-52(1976))。作者观察到6个病人中有5个其生长激素明显增加。

因此，一般说来，生理学家都知道给动物服用雌激素会增加或往往导致增加动物的生长激素浓度。

本发明提供了增加经济哺乳动物血流中内源性生长激素浓度的协同方法，该方法包括同时施用协同有效量的雌激素和生长激素释放因子。

此发明提供了一个在本技术范围内的重大的改进，因为本协同结合使处理过的动物产生和分泌出的生长激素量明显地大于我们所预料的、即产生由GRF 和雌激素导致的已知的增长水平。

本发明一般适用于经济哺乳动物，其中最佳的动物是乳牛。牛科动物或牛构成最佳哺乳动物种类，而牛和猪也是较佳的一类。牛、猪和绵羊是较佳的第三类。本发明还用于其他的经济哺乳动物，包括山羊、骆驼、马等，但是用于这样的动物目前没有价值。

正如上述解释，由一物种而得的GRF 会增加其他物种的生长激素，因此，在实施本发明时，不必只使用被处理物种的GRF。最好施用同样物种的GRF，例如将羊科的GRF 施用于绵羊。然而，当对任何经济哺乳动物施用任何哺乳动物物种的GRF 时，将取得本发明的效益。例如，可以把人的GRF 给猪，绵羊或牛，可以把牛科的GRF 给绵羊或猪，猪的GRF 可以给牛或绵羊、等等。根据经济的考虑或方便本发明的效益将会有把握地得到。

当然，可以使用从动物器官中分离出来的GRF，但是更加切实可行的方法是合成或用重组的方法制备GRF。肽的合成和重组生产方法都现成的，而且由此已经制备许多种类的GRF。请阅主题文献汇编中的美国专利4,585,756和4,605,643。

业已表明，不仅完整的GRF，而且许多GRF的相似物都可以有效地提高生长激素的产量和释放。例如，已经全部制备了23、27、29、30、31、34、37和40氨基酸的人类GRF相似物并发现全部有效。但是，开头29个氨基酸仿佛提供了最大限度的活性。而且，酰胺化的和酸末端化的相似物和完整的GRF都已表明是有效的。

因此，在本技术领域，人所共知的常识是：完整的GRF以及GRF相似物以酰胺化和酸末端化的形式，会增加同系物种的生长激素，并且同样会增加其他物种的生长激素。于是，在本发明的实施中，术语“生长激素释放因子(GRF)”用来包括酰胺化的和酸的形式的所有哺乳动物的GRF，以及所有GRF有效相似物。本技术领域的专业人员知道怎样识别有效的相似物，以及怎样滴定给定种类的GRF剂量，以便在给定的物种中得到最佳结果。

虽然从得到功效的观点出发，任何雌激素物质均可以用作本发明的雌激素剂，但是只有那些适于施用于食用动物的雌性激素物质才可投入实际使用。按生理学家的一般理解，雌激素物质是给正常雌性动物服用，会引起子宫和乳头生长的物质。正如所有的生理学家所知道的那样，大量的甾族化合物，主要是雌激素，它们在本发明中是很有效的。请参阅Applezweig, Steroid Drugs. McGraw-Hill Vol (1962) 和 Vol I II (1964)中的雌激素的综合性研究。

但是在实际使用中，可做食物用的动物所能接受的雌激素是雌酮、雌二醇和玉米赤霉醇，以及这些物质的酯衍生物。确认有效的雌激素是那些在雌二醇和玉米赤霉醇的一个或两个可利用羟基上，或在雌酮的一

个羟基上形成的简单酯类如： C_1-C_6 的烷酸酯和苯甲酸酯，例如，苯甲酸雌二醇酯、双丙酸雌二醇酯、醋酸雌酮酯、己酸玉米赤霉醇酯、二丁酸玉米赤霉醇酯等都是本发明的可用作所需要的雌激素试剂的典型试剂。

本发明使用的理想的雌激素是玉米赤霉醇和雌二醇，较好的雌二醇其基本的形式或其 C_1-C_6 烷酸酯或苯甲酸酯效果相等。具体最理想的雌激素是玉米赤霉醇、雌二醇、苯甲酸雌二醇酯和双丙酸雌二醇酯。

本发明的定义包括同时施用雌激素和GRF。术语“同时”意指以下述方法施用上述两种药剂，即两者同时以适当的剂量作用于产生和分泌生长激素的器官，以协同地提供本发明的效益。当然，这并不意味着两种药物必须精确地一起施用，如同时精确地一次注射两种药物。相反任何能使两者同时起效的任何实用的方法给药均可用于该两种药剂。

例如，最佳的给药方法是采用能连续给药的，所用的剂型或剂量装置，基本上是以一个分子跟一个分子的方式释放药物。

然而可用许多其他的方法进行同时给药。例如，这些药物可以用渗透泵或机械泵进行脉冲式的给药，这些泵以预定的间隔输送既定量的药物。实际上，GRF 的脉冲式给药是一种理想的方法，因为生长激素的分泌是阵发性的，所以GRF 的脉冲式给药比它的连续式给药更加有效。因此，雌激素的连续给药（正如从硅氧烷聚合物植入片那样）和GRF 的脉冲式给药是本发明的另一理想的实施例。在本发明的构思中，如此的给药方法是同时的，因为在动物的受体器官随时可以吸收药物时，两种药物可同时存在于该动物体的系统内。

当采用GRF 的脉冲式给药时，脉冲频率应该足以使生长激素阵发性释放的次数增加而超过正常值。不同物种的频率不同。但是，一般说来，GRF 的脉冲式给药频率应该是在每天8-24个脉冲的范围内，较理想的是每天约12-24个脉冲。必须注意到，生长激素的分泌受到动物性别和状态的影响，在某些情况下，GRF 脉冲的最佳频率因刚才所述的原因而发

生变化。

从长远的经济意义来看，雌激素和GRF 连续给药是可取的。这种措词的意思是以足够长的时间进行给药，该时间可长到直至增加生长激素的经济效益成为现实为止。但是最好在被处理的哺乳动物生命的某个整阶段中连续给药。例如，就奶牛而言，最好在整个哺乳期连续给药。就肉牛或小肉牛而言，最好在整个成熟期的发育或最后阶段连续给药。

于是，本发明的使用最佳时间周期至少约为90天。显而易见，由于给药周期总是以足以收到增加生长激素的效果并在受处理动物身上取得经济效益为满足的，因此，另一可取的给药周期至少为30天左右。可以认为，至少应该连续给药14天左右，以便保证获得本发明的某些效益。

本发明的具体效益在于在被处理的哺乳动物血液中所增加的生长激素。似乎直到由分泌腺分泌出并掺于血流中循环后，生长激素才起作用。因此，要用“血流中生长激素”这一术语来说明本发明的效益，而不能仅仅用“生长激素的产生”来说明之。

可以用许多不同的方法完成本发明实施中GRF 和雌激素给药的例行步骤。当然，由于口服GRF 不能被吸收，GRF 必须用某种方法进行肠胃外的给药。如果需要的话，可以口服雌激素剂，但是口服剂量率要比肠胃外给药的剂量率高许多倍。因此，雌激素的肠胃外给药方式是十分可取的。如果需要的话，通常的口服给药方法可用于雌激素，例如混合在食物内、口服的大丸剂、片剂、液体等。

可以把两种药物稀释到合适的体积，而且用机械泵进行静脉内、肌肉或皮下的给药。在下文所示的操作实例中，所采用的这类泵可以用许多不同的方式进行操作。但是不管怎样，需要在动物体的合适部位有一根永久固定的针。用植入的电池驱动泵或化学驱动泵也可以达同样的效果，该泵可永久地安装在动物的皮肤下。

这两种药物不需要用同样的制剂或装置给药。

用油-蜡混合物制成肽的制剂可以得到GRF的相当适用的缓释剂型。对青霉素的给药,在许多年前,美国专利2,493,202介绍了类似的制剂。Davis等人介绍了用油-蜡组合物给绵羊施用生长激素

〔J.Dairy Sci.66,1980-82(1983)〕。这些组合物一般在植物油中含有5-10%蜡。合适的蜡包括巴西扇棕蜡、蜂蜡等,最常用的油是花生油或芝麻油。当然根据GRF所需的日剂量很容易计算出制剂中的GRF浓度和注射的制剂量。

可用硅氧烷聚合物的可植入装置而非常方便地施用雌激素。参见美国专利4,191,741,该专利介绍了一种特别适用于雌二醇投药的装置。

可以用微胶囊的形式施用两种药物。将药物和其他物质的微囊化作为研究的课题已有多多年。为了便于读者的理解,特叙述下面一些参考文献,兽医药剂师将知道下文及许多有关微囊化的其他文献资料。

Goosen等人采用由半透性膜组成的胶囊,使移植的活组织或活细胞微囊化。美国专利4,487,758介绍藻酸盐是可取的。对于许多相同的效应叙述于Damon公司的出版物(如美国专利4,352,883和4,409,331)。

美国专利4,479,911和专利合作条约出版物83/03061介绍用多聚乳酸和聚乙醇酸来制备微胶囊。

也许使用最广的微囊类是那些含有纤维素酯类的物质,例如乙酸纤维素或丁酸纤维素。有关这方面内容的典型文献有美国专利3,954,678和3,859,228以及英国专利1,297,476。

最近有人设计了用于肽给药的扩散驱动的植入装置,可以很方便地用于GRF的给药。美国专利4,452,775介绍了由具有适当粘合的胆甾醇和润滑剂组成的基质,美国专利4,526,938介绍了水凝胶形成的聚合物。根据这些专利所介绍的方法可制备上述的聚合物的基质,可以把聚合物的基质和GRF混合,并且按照制剂技术中惯用的方法进行调整,从而得到待处理动物所需要的GRF剂量范围。

进一步说，可以用渗透压驱动泵进行其中一种或二种药物的给药。就制造这些装置而言，ALza公司特别以制造这类装置而著名。一般说来，渗透压驱动的装置使用一种半透膜将活性成份的贮主和身体分开，并且从而控制活性成份的释放速度。

施用本发明药物的最佳的，也是方便的方法是采用分离装置。在此方法中，用一种可植入的装置施用雌激素剂，这一装置在整个操作期间，基本上连续地输送所需量的雌激素。就输送雌激素而言，硅氧烷聚合物装置是最理想的。在另一方面，用独立的植入泵或可注射的剂型施用GRF，其剂型例如油-蜡制剂或聚合的基质。GRF可如上所述以连续给药或间断给药。当GRF采用机械的植入泵给药时，用程序泵很容易实现间断给药，该程序泵以所需的间隔时间释放脉冲。

通过对动物施用协同有效的生长激素增加量的雌激素和GRF，引起生长激素的增加，这就是本发明的效益所在。那些组合药物产生的生长激素的增加量大于任何（二者之一）单独用药所能够达到的生长激素增加量。一般，就绵羊、山羊或猪而言，GRF的有效量大约在0.5至3毫克/天的范围内，而牛约在3至12毫克/天的范围内。在本文中所讨论的剂量和剂量范围是就日剂量而言，但是读者必须懂得，日剂量基本上是连续施用的，或在整个24小时内以脉冲式等分次给药。对于绵羊、猪或山羊施用的较可取的GRF剂量范围大约为1至2毫克/天，而牛约为4至8毫克/天。博学的读者可能知道，关于GRF的研究仍然处于高潮，而且很有可能发现更有效的GRF相似物。当然，更有效的GRF相似物的最佳剂量将会少于本文所确定的量。就某一动物而言，最有效益的剂量随着如下的因素变化而变化：动物的大小、健康和营养状况、是连续输送还是间隔输送、所希望的生长速度或产奶数量、待使用的GRF的同一性。使用普通的试验来滴定各种不同的GRF剂量率，从而找出具有最佳协同效果的最佳日剂量。

就牛而言，雌激素的正确剂量约在10至500 微克 / 天的一般范围内，而猪、山羊和绵羊约为3 至150 微克 / 天。牛的较佳剂量范围约为10至100 微克 / 天，而猪、山羊和绵羊的较佳剂量约为3 至35微克 / 天。牛的最佳剂量范围约为50至100 微克 / 天，而猪、山羊和绵羊的最佳剂量约为15至35微克 / 天。更概括地讲，当将特殊的雌激素用作合成代谢试剂时，此雌激素的剂量与常规所用的相同则为有利。

当然，动物科学家会了解到，在现在惯用的养殖实施条件下，对于给定的动物组施用雌激素和GRF 的最适剂量，必须应用畜牧业的基本实验操作法经实验来确定。

用下述操作的实例，说明本发明的意想不到的优点。

实例1

在实验开始之前，将重约32公斤的阉羊群关入代谢笼内约7 天。其中半数的阉羊已在实验前25天植入含有雌二醇的硅氧烷聚合物的植入物，在此实验期间植入物释放的雌二醇约为25微克 / 天。在处理的预定安排开始前二天，在每只阉羊的每根颈静脉中插入硅橡胶套管(Dow Corning 公司)。将4 只动物(二只有植入体和二只没有)分别用三种GRF 处理方案：1.5 毫克 / 天，0.33毫克 / 天和空白对照。所用的GRF 是呈酸式的hGRF，它是根据Merrifield等人的一般的固相合成法合成的〔Biochemistry 21 5020(1982)〕。

采用哈佛式的蠕动泵，通过其中一根套管向受试阉羊连续5 天注入GRF。用生理盐水把GRF 稀释到一定浓度以使其实际输入液流量为每分钟0.5 毫升。

每天从每只阉羊身上采集6 只血样，取样从输液前第一天开始并一直延续到输液结束后的第一天。两个血样于每次1 小时随意进食刚开始之前的1 小时内取得，一个血样则于每次进食结束时取得。这些动物以12小时的间隔，每天吃二次饲料，每次吃一小时。在输液开始的前一小

时和输液刚开始前、开始后的10分钟和60分钟取另外的血样。在注入期结束时，在注入终止以后的10、20、30和60分钟取得另外血样。

把血浆从血样的其他成分中分离出，用标准的放射免疫学方法分析该血浆的生长激素。

下表报导了动物中生长激素水平，所记载的是规定时间内所有分析的方法。栏首为雌二醇的该栏中“+”表示植入了雌二醇的动物的数据。

表 I

hGRF的处理		血浆生长激素 (毫微克 / 毫升)							
		注入期 (天)							
毫克 / 天	雌二醇	预处理	1	2	3	4	5	后处理	
对照物	+	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	

实例2

本实验基本上是根据实例1 的方案进行的。在此试验中，GRF 是一种具有丝氨酸的hGRF的相似物，该丝氨酸代替了在27位置中的蛋氨酸；

用重组体方法制备的GRF。采用以下四种hGRF的剂量：0.75毫克/天、1.5毫克/天、3.0毫克/天和对空白对照物。对四只绵羊羔分别施以上述每个剂量的hGRF，半数的绵羊羔按实例1所述的方法植入雌二醇植入物。

采用IVAC型630泵(IVAC公司、San Diego)通过皮下的硅橡胶管注入hGRF。用生理盐水稀释hGRF以使每只动物每天能输入48毫升液体。

按实例1所述方法从每只动物身上取血样并分析，以在实例1中所用的同样形式于下表II中列出生长激素的分析数据。

表 II

血浆生长激素(毫微克/毫升)

hGRF的处理 毫克/天	雌二醇	预处理	注入期 (天)					后处理
			1	2	3	4	5	
对照物	+	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