

(19) DANMARK



(12) PATENTSKRIFT

(11) 170758 B1

Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 6647/87

(22) Indleveringsdag: 17 dec 1987

(41) Alm. tilgængelig: 23 jun 1988

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 15 jan 1996

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 22 dec 1986 US 945114

(51) Int.Cl.6

A 61 K 38/27  
//(A 61 K 38/27,  
A 61 K 31:565)

(73) Patenthaver: \*Eli Lilly and Company; Lilly Corporate Center; Indianapolis; Indiana 46285, US

(72) Opfinder: Jack Fredrick \*Wagner; US

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Fremgangsmåde til forøgelse af koncentrationen af endogent væksthormon i blodet hos et husdyr valgt blandt kvæg, grise, får, geder, kameler og heste

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

6647-87

Koncentrationen af endogent væksthormon i blodet hos et husdyr forøges ved samtidig indgivelse af et østrogen og en væksthormon-frigørende faktor.

Herved opnår man en forbedret foderudnyttelse og hos malkekvæg tillige en forøget mælkeproduktion.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til forøgelse af koncentrationen af endogent væksthormon i blodet hos dyr valgt blandt kvæg, grise, får, geder, kameler og heste.

5

En vigtig del af den senere tids eksplosive udvikling i forskningen inden for peptidkemien og indvirkningen af protein-hormoner på alle livsformer har drejet sig om forskning på væksthormon-området. Studier af produktionen af væksthormon hos forskellige dyr har vist, at et relativt lille peptid, som er kendt som den væksthormonfrigørende faktor, spiller en vigtig rolle i produktionen og udskillelsen af væksthormon hos samtlige de dyrearter, som er blevet undersøgt. Det er meget interessant, at den endogene væksthormon-frigørende faktor (GRF) er et næsten identisk peptid i alle de dyrearter, hvis GRF'er er blevet sekvenseret. Der er tale om et peptid på 43 eller 44 aminosyrer i alle kendte arter, og peptidets syreterminal er amideret hos alle de kendte dyrearter med undtagelse af rotten. Sekvensen af aminosyrer i de forskellige endogene GRF'er er næsten den samme i alle tilfælde. Således er okse-GRF identisk med gede-GRF.

I nærværende beskrivelse benyttes følgende nomenclatur: udtrykket "væksthormon-frigørende faktor" (GRF) benyttes i bred forstand til at beskrive et hvilket som helst peptid, hvis funktion er at forøge produktionen og frigørelsen af væksthormon i et husdyr. Udtrykket "endogen GRF" benyttes som GRF, som produceres naturligt af et dyr. Når der er tale om GRF'er, som er produceret ad syntetisk eller rekombinant vej, benytter man et initial til at angive den dyreart, hvis GRF er blevet duplikeret, eksempelvis "h" for human, "b" for bovin etc. Når en GRF er i syreform, er dette angivet. I alle andre tilfælde er der tale om en

amideret GRF. Udtrykket "analog" benyttes om peptider, som har samme funktion som GRF'er, men som har færre aminosyrer end den endogene GRF eller en anden aminosyresekvens. Syntetiske GRF'er, som indeholder færre aminosyrer end den endogene GRF, er angivet ved et tal. Eksempelvis betyder udtrykket "hGRF29" en GRF, som består af de første 29 aminosyrer i human endogen GRF.

Fordelene ved at forøge væksthormon-niveauet i et husdyr er efterhånden velkendte. Den mest iøjnefaldende kendte fordel er den forøgelse af mælkeproduktionen hos en malkeko, som opnås, når niveauet af væksthormon forøges. Forøgede væksthastigheder og en forøget fodereffektivitet hos grise og får, hvis væksthormon-niveauer er blevet forøget, er beskrevet i litteraturen. De samme fordelagtige virkninger er endnu ikke omtalt i forbindelse med kvæg, men man må gøre sig klart, at væksthormoner og GRF'er stadig er knappe og kostbare, og det må derfor formodes, at der endnu ikke har været foretaget nogen opfodringsforsøg på kvæg med nogen af disse midler. Igennem nogle år har man forøget væksten hos abnormt små børn ved direkte indgivelse af væksthormon, hvilket er forbundet med store udgifter på grund af vanskeligheden med at fremskaffe hormonet, og man har foreløbig ikke foretaget nogen nævneværdige undersøgelser med hensyn til anvendelsen af væksthormon på husdyr.

Den GRF, som hidtil er undersøgt i størst omfang, er naturligvis den humane GRF. Det har vist sig, at det endogene humane GRF-peptid kan modificeres i stor udstrækning, uden at man derved ødelægger peptidets effektivitet med hensyn til at forøge produktionen og udskillelsen af væksthormon. Man har fremstillet humane GRF-analoge på 23-40 aminosyrer i både amideret og syre-termineret form, og

disse analoge har vist sig at være aktive. Endvidere har man foretaget forskellige ændringer i det endogene peptid, idet man f.eks. har erstattet tyrosin i peptidets 1-stilling med histidin, 3-methylhistidin og N-acetyltyrosin. De herved fremkomne substanser er ligeledes effektive.

I lyset af den store indbyrdes lighed imellem de endogene GRF'er fra forskellige dyrearter er det måske ikke overraskende, at de typisk er effektive på tværs af dyrearterne. F.eks. har Kraft et al., Domestic Animal Endocrinology 2, 133-39 (1985) vist, at endogen human GRF og en human GRF-analog, som indeholder 40 aminosyrer og en fri syre-terminal (hGRF40-syre), begge er aktive i rotter, rhesusaber, kaniner, får, kvæg og kyllinger, såvel som i mennesker.

Der findes en stor mængde litteratur, som omhandler GRF og dennes rolle i forbindelse med produktion og udskillelse af væksthormon. De følgende artikler kan give et overblik og danne indgang til litteraturen:

Ling et al., Ann. Rev. Biochem. 54, 403-23 (1985)

Baird et al., Neuroendocrinology 42, 273-76 (1986)

Kensinger et al., Fed. Proc. 45, 280 (1986)

Wehrenberg et al., Endocrinology 114, 1613-16 (1984).

Det har vist sig, at en indgivelse af østrogener til dyr i mange tilfælde også fører til en forøgelse i koncentrationen af endogent væksthormon. F.eks. har Frantz et al., J. Clin. Endocr. 25, 1470-80 (1965) fundet, at en indgivelse

af store doser diethylstilbestrol til normale mænd bevir-  
kede en forøgelse af koncentrationen af væksthormon, målt  
under faste hos patienterne. Trenkle, J. An. Sci. 31, 389-  
93 (1970), observerede forøgede mængder af væksthormon hos  
5 tyrekalve, som blev fodret med et konventionelt foder,  
hvortil der var sat stilbestrol i en mængde på 10 mg pr.  
dyr pr. dag.

Ethinyløstradiol eller "konjugerede østrogener" er blevet  
10 indgivet intravenøst til normale mænd; se Weidemann et  
al., J. Clin. Endocr. and Metab. 42, 942-52 (1976). Disse  
forskere observerede en signifikant forøgelse i koncentra-  
tionen af væksthormon hos 5 ud af 6 patienter.

15 Fysiologerne er således generelt på opmærksomme på, at en  
indgivelse af østrogener til dyr forøger (eller har ten-  
dens til at forøge) dyrenes koncentration af væksthormon.

Med den foreliggende opfindelse tilvejebringes en synergi-  
20 stisk metode til at forøge koncentrationen af endogent  
væksthormon i blodet hos husdyr, hvilken metode består i  
en samtidigt indgivelse af synergistisk effektive mængder  
af et østrogen og en væksthormon-frigørende faktor.

25 Den foreliggende opfindelse indebærer et signifikant frem-  
skridt i forhold til den kendte teknik, fordi den omhand-  
lede synergistiske kombination bevirker, at de behandlede  
dyr producerer og udskiller mærkbart forøgede mængder af  
væksthormon i forhold til hvad man måtte forvente ud fra  
30 kendte forbedringer, som opnås ved hjælp af GRF og østro-  
gener hver for sig.

Opfindelsen er nyttig i forbindelse med husdyr valgt  
blandt kvæg, grise, får, geder, kameler og heste, idet det

mest foretrukne dyr er malkekoen. Okser eller kvæg udgør den mest foretrukne klasse af dyr, men også grise og får er foretrukne dyr. Opfindelsen finder også anvendelse på geder, kameler og heste, men anvendelsen i forbindelse med sådanne dyr er umiddelbart af mindre betydning.

Som det blev forklaret ovenfor, vil GRF fra en given dyreart forøge koncentrationen af væksthormon hos andre dyrearter. Ved den praktiske udøvelse af den foreliggende opfindelse behøver man således ikke kun at anvende GRF fra den dyreart, som man ønsker at behandle. Man foretrækker at indgive GRF fra den samme dyreart, f.eks. at indgive fåre-GRF til får. Imidlertid opnår man opfindelsens fordele, når blot man indgiver GRF fra et vilkårligt pattedyr til et husdyr. F.eks. kan man indgive human GRF til grise, får eller kvæg, okse-GRF kan indgives til får eller grise, svine-GRF kan indgives til kvæg eller får osv., idet man tager hensyn til økonomien og bekvemmeligheden.

Naturligvis kan man anvende GRF, som er isoleret fra dyreorganer, men det er meget mere praktisk at fremstille forbindelsen syntetisk eller ved rekombinante metoder. Såvel den syntetiske som den rekombinante produktion af peptider er efterhånden blevet sædvanlig, og der er på denne måde blevet fremstillet GRF-typer, se f.eks. US-patentskrifterne nr. 4 585 756 og 4 605 643.

Det har vist sig, at ikke kun de fuldstændige GRF'er, men også mange GRF-analoge, er effektive GRF-analoge, er effektive til at forøge produktionen og frigørelsen af væksthormon. F.eks. er de analoge til human GRF, som indeholder henholdsvis 23, 27, 29, 30, 31, 34, 37 og 40 aminosyrer, alle blevet fremstillet, og de har alle vist sig at være effektive. Det ser imidlertid ud til, at det er de

første 29 aminosyrer, som leverer størstedelen af aktiviteten. Desuden har både de amiderede og de syreterminerede analoge og de fuldstændige GRF'er vist sig at være effektive.

5

Det må således formodes at være almindelig kendt på fagområdet, at fuldstændige GRF'er og GRF-analoge, såvel i amideret som i styretermineret form, vil forøge dannelsen af væksthormon i både homologe arter og i andre arter. Ved den praktiske udnyttelse af opfindelsen vil man således benytte udtrykket "væksthormon-frigørende faktor (GRF)" om alle pattedyr-GRF'er og alle effektive analoge til disse GRF'er, såvel i amideret form som i syreform. Fagmanden vil vide, hvorledes man genkender de effektive analoge, og hvorledes man bestemmer dosen af en given GRF-type for at opnå det optimale resultat i en given dyreart.

Ud fra et effektivitetssynspunkt kan man som østrogen middel anvende en hvilken som helst østrogen substans ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, som ved den praktiske udøvelse af opfindelsen kan man kun benytte de østrogene substanser, som kan accepteres til indgivelse til husdyr. Ved en "østrogen substans" forstår fysiologerne sædvanligvis en substans, som ved indgivelse til et normalt dyr af hunkøn vil bevirke vækst af uterus og brystvorter. Som det vil være velkendt for alle fysiologer, findes der temmelig mange forbindelser, primært steroider, som er østrogener og derfor er effektive i forbindelse med den foreliggende opfindelse. Der kan henvises til Applezweig, Steroid Drugs, McGraw-Hill, Vol. I (1962) og Vol. II (1964) for en mere udtømmende omtale af østrogener.

I praksis er de acceptable østrogener, som kan bruges i fødevareproducerende dyr, stofferne østron, østradiol og

zeranol samt ester-derivaterne af disse stoffer. De simple estere, såsom C<sub>1-6</sub>-alkanoaterne, og benzoaterne, som er dannet på en eller to af de tilgængelige hydroxygrupper i østradiol og zeranol eller på hydroxygruppen i østron, er velkendte som nyttige østrogener. Således er østradiolbenzoat, østradioldipropionat, østronacetat, zeranol-hexanoat, zeranoldibutyrat og lignende typiske eksempler på midler, som kan benyttes efter ønske som østrogene midler ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

10

De foretrukne østrogener til anvendelse ifølge opfindelsen er zeranol og østradiol. Østradiol er lige foretrukken, uanset om forbindelsen er i den grundlæggende form eller i form af C<sub>1-6</sub>-alkanoater eller benzoat. De mest foretrukne specifikke østrogener er Zeranol, østradiol, østradiolbenzoat og østradioldipropionat.

15

Således som den foreliggende opfindelse er defineret, omfatter den en samtidig indgivelse af et østrogen og en væksthormon-frigørende faktor (GRF). Ved udtrykket "samtidig" forstås, at de to midler indgives på en sådan måde, at de begge er tilgængelige for de væksthormon-producerende og -udskillende organer på samme tid og i tilstrækkelige mængder til på synergistisk måde at frembringe opfindelsens fordele. Naturligvis skal det ikke forstås på den måde, at begge midler skal indgives nøjagtigt samtidig, f.eks. ved en præcis samtidig injektion af de to midler på en gang. I stedet skal de to midler indgives på en hvilken som helst praktisk måde, hvormed man kan sikre, at de begge samtidigt er tilgængelige.

20

25

30

En foretrukken administrationsmetode er eksempelvis en kontinuerlig indgivelse, hvortil man anvender dosisformer eller



doseringsanordninger, som afgiver de to midler praktisk talt molekyle til molekyle.

5 En samtidig indgivelse kan imidlertid også foretages på man-  
ge andre måder. Således kan midlerne administreres puls-vis,  
f.eks. ved hjælp af osmotiske eller mekaniske pumper, som  
afgiver en afmålt mængde af midlet med på forhånd fastlagte  
intervaller. En sådan puls-vis indgivelse af GRF er faktisk  
10 en foretrukken procedure, fordi det har vist sig, at udskil-  
lelsen af væksthormon forekommer tilfældigt, og derfor er en  
pulseret indgivelse af GRF mere effektiv end en kontinuerlig  
indgivelse af midlet. En kontinuerlig indgivelse af østrogen-  
net, f.eks. ved hjælp af en implanteret siliconepolymer, og  
en pulsvis indgivelse af GRF er således en yderligere fore-  
15 trukken udførelsesform for opfindelsen. En sådan indgivel-  
sesmetode er "samtidig" i opfindelsens forstand, eftersom  
begge midler samtidigt er tilstede i dyrets system på det  
tidspunkt, hvor dyrets receptororganer er i stand til at ac-  
ceptere midlerne.

20 Når man benytter en puls-vis indgivelse af GRF, bør impul-  
serne tidsmæssigt indstilles på en sådan måde, at de er  
hyppige nok til at forøge antallet af episoder, hvor der  
sker frigørelse af væksthormon, til over det normale ni-  
25 veau. Frekvensen er forskellig fra dyreart til dyreart.  
Generelt bør frekvensen for puls-vis GRF-administration  
imidlertid ligge mellem ca. 8 dage og ca. 24 impulser pr.  
dag, fortrinsvis mellem ca. 12 og ca. 24 impulser pr. dag.  
I denne forbindelse skal man huske, at udskillelsen af  
30 væksthormon påvirkes af dyrets køn og tilstand, og under  
visse betingelser kan den optimale frekvens af GRF-  
impulserne variere i forhold til de ovenfor angivne.

Det foretrækkes, at man fortsætter indgivelsen af østrogen og GRF i en tidsperiode, hvis udstrækning er økonomisk signifikant. Herved forstås, at man foretager indgivelsen over en tidsperiode, som er lang nok til, at de økonomiske fordele ved den forøgede produktion af væksthormon bliver 5  
evidente. Det foretrækkes især, at indgivelsen udstrækkes over et givet udviklingstrin i det behandlede dyrs liv. Når der f.eks. er tale om malkekvæg, vil man foretrække at foretage indgivelsen over en helt mælkegivningsperiode. 10  
Når det drejer sig om køer eller kalve til kødproduktion, vil man foretrække at udstrække indgivelsen over hele det voksende eller afsluttende trin af dyrets modning.

Den mest foretrukne tidsperiode, hvorunder man udnytter den foreliggende opfindelse, er således mindst ca. 90 da- 15  
ge. En anden foretrukken tidsperiode er mindst ca. 30 dage, eftersom det må formodes, at denne tidsperiode altid vil være lang nok til, at effekten af den forøgede produktion af væksthormon bliver evident og fremkalder en økonomisk fordel i forbindelse med det behandlede dyr. Det må 20  
antages, at administrationen altid skal udstrækkes over mindst ca. 14 dage, for at man kan være sikker på, at der opnås en vis fordel af opfindelsen.

Den specifikke fordel ved opfindelsen er beskrevet som et forøget niveau af væksthormon i det behandlede dyrs blod. Det ser ud til, at væksthormonet ikke bliver effektivt i kroppen, før det er blevet udskilt fra de producerende kirtler og bragt i cirkulation i blodstrømmen. Den fore- 25  
liggende opfindelses fordele er således fastlagt på grundlag af niveauet af væksthormon i blodstrømmen og ikke på 30  
grundlag af en simpel produktion af væksthormon.

De mekanismer, hvormed man indgiver GRF og østrogen ved den praktiske udøvelse af opfindelsen, kan have en række forskellige former. Naturligvis er det nødvendigt på en eller anden måde at administrere GRF parenteralt, eftersom 5 der ikke kan ske nogen absorption ved oral indgivelse. Om ønsket kan det østrogene middel indgives oralt, men de orale dosisniveauer er mange gange højere end de parenterale dosisniveauer. Det betyder, at man i høj grad foretrækker en parenteral indgivelse af østrogenet. De sædvanlige 10 orale metoder, såsom blanding med føden, oralt administrerede tabletter eller væsker til oral indgivelse kan om ønsket anvendes til administration af østrogenet.

Begge midler kan fortyndes til et passende volumen og injiceres intravenøst, intramuskulært eller subkutant ved 15 hjælp af en mekanisk pumpe. Sådanne pumper, som er benyttet i de nedenfor angivne udførelseseksempler, kan fås i et antal forskellige typer. Det eneste, der kræves, er en permanent anbragt nål i en passende lokalisering i dyrets 20 krop. Den samme effekt kan opnås med en implanteret batteridrevet eller kemisk drevet pumpe, som kan være installeret permanent under dyrets skind.

De to midler behøver ikke at blive afgivet fra samme formulering eller anordning. 25

En meget bekvem GRF-form med langsom frigivelse kan opnås ved at fremstille en formulering af peptidet i en olie-voks-blanding. Lignende formuleringer er beskrevet for 30 mange år siden, eksempelvis i US-patentskrift nr. 2 493 202, til administration af penicillin. Davis et al., J. Dairy Sci. 66, 1980-82 (1983), beskriver indgivelsen af væksthormon til får i en olie-voks-præparation. Sådanne præparationer omfatter generelt 5-10% voks i en vegeta-

bilsk olie. Egnede voksorter omfatter carnaubavoks, bivoks og lignende, og de hyppigst anvendte olier er jordnøddolie og sesamolie. Koncentrationen af GRF i formuleringen og den mængde af formuleringen, som skal injiceres, kan  
5 naturligvis let beregnes på grundlag af den ønskede daglige dosering af GRF.

Indgivelsen af østrogen kan meget bekvemt administreres ved hjælp af implanterbare siliconepolymer-anordninger.  
10 Der kan f.eks. henvises til US-patentskrift nr. 4 191 741, som beskriver en særligt bekvem anordning til administration af østradiol.

Begge midler kan administreres i form af mikrokapsler. Mikroindkapsling af medikamenter og andre substanser har været genstand for forskning i mange år. De følgende referencer skal nævnes til orientering for læseren af nærværende beskrivelse, idet veterinærpharmaceuter vil være opmærksomme på både de her nævnte referencer og talrige andre referencer, som angår mikroindkapsling:  
15  
20

Goosen et al. har foretaget mikroindkapsling af levende væv eller celler til implantation, idet der anvendtes kapsler fremstillet af semipermeable membraner. Alginate blev foretrukket (se US-patentskrift nr. 4 487 758). Stort set samme formål tjener publikationerne fra Damon Corporation, såsom US-patentskrifterne nr. 4 352 883 og  
25 4 409 331.

30 Man har anvendt polymælkesyre og polyglycolsyre til dannelse af mikrokapsler; se US-patentskrift nr. 4 479 911 og PCT-publikation nr. 83/03061.

Den måske mest udbredte type af mikrokapsler er den type, som omfatter celluloseestere, såsom celluloseacetat eller cellulosebutyrat. Typiske publikationer er US-patentskrifterne nr. 3 954 678 og nr. 3 859 228 samt GB-patentskrift  
5 nr. 1 297 476.

Fornyelig har man fremstillet diffusionsdrevne implanterbare anordninger til administration af peptider, og disse kan bekvemt anvendes i forbindelse med administration af  
10 GRF. I denne forbindelse kan henvises til US-patentskrifterne nr. 4 452 775, som beskriver en matrix bestående af kolesterol sammen med passende bindemidler og smøremidler, og US-patentskrift nr. 4 526 938, som beskriver en hydrogel-dannende polymer. Sådanne polymermatricer kan frem-  
15 stilles som beskrevet i de nævnte patentskrifter, og de kan kombineres med GRF og justeres i overensstemmelse med sædvanlige procedurer til opnåelse af den ønskede dosering af GRF til dyret, som skal behandles.

20 Endvidere kan det ene middel eller begge midlerne administreres ved hjælp af osmolalitätsdrevne pumper. Firmaet Alza Corporation er særligt bemærket i forbindelse med konstruktion af sådanne anordninger. Generelt gør osmolalitätsdrevne anordninger brug af en semipermeabel membran  
25 til at adskille et reservoir, som indeholder den aktive bestanddel, fra kroppen og til at kontrollere den hastighed, hvormed den aktive bestanddel frigøres.

30 En særligt foretrukken og bekvem metode til at administrere midlerne ifølge opfindelsen består i at anvende separate administrationsanordninger. Ifølge denne udførelsesform administreres det østrogene middel fra en implanterbar anordning, som i det væsentlige kontinuerligt afgiver den ønskede dosis østrogen over hele anordningens levetid. Til

afgivelse af østrogen er en silikonepolymer-anordning særligt foretrukken. På den anden side administreres GRF fra en separat implanteret pumpe eller en injicerbar doseringsform, såsom en olie-voks-præparation eller en polymeriseret matrix. Administrationen af GRF kan være kontinuerlig, eller den kan være periodevis som beskrevet ovenfor. Når GRF administreres fra en mekanisk implanteret pumpe, kan man let opnå en periodevis afgivelse ved hjælp af en programmeret pumpe, som afgiver en impuls med de ønskede intervaller.

En forøgelse af koncentrationen af væksthormon, som er fordelen ved den foreliggende opfindelse, frembringes ved at administrere synergistisk effektive mængder af østrogen og GRF, som forøger produktionen af væksthormon, til dyret. Disse mængder er sådanne, som i kombination frembringer en større forøgelse af væksthormon-produktionen, end midler er i stand til hver for sig. Generelt ligger de effektive mængder af GRF på mellem ca. 0,5 og ca. 3 mg pr. dag for geder, får og grise, mens mængderne er mellem ca. 3 og ca. 12 mg pr. dag for kvæg. De nævnte doser og dosisområder er udtrykt som daglige doser, men det er vigtigt at huske, at den daglige dosis skal indgives i det væsentlige kontinuerligt eller i passende periodevise doser over døgnets 24 timer. Mere foretrukne dosisområder ligger på mellem ca. 1 og ca. 2 mg GRF pr. dag for grise, får og geder og på mellem ca. 4 og ca. 8 mg pr. dag for kvæg. Den kyndige læser vil forstå, at forskningen inden for GRF fortsat er intens, og at der meget vel kan blive fundet GRF-analoge med kraftigere virkning. De foretrukne doser for sådanne analoge med mere kraftig virkning vil naturligvis være mindre end de ovenfor angivne doser. Den mest fordelagtige dosis til et givet dyr vil variere med dyrets størrelse, dets helbredstilstand og dets ernærings-

tilstand, ligesom doseringen afhænger af, hvorvidt afgivelsen er kontinuerlig eller periodevis, samt at den ønskede væksthastighed eller mælkeproduktion og af identiteten af den anvendte GRF. Man benytter trivielle eksperimenter til at bestemme doseringsmængderne for de forskellige GRF'er og til at finde den optimale daglige dosis, som giver den bedste synergistiske virkning.

Den korrekte dosis af østrogen ligger i området fra omkring 10 til omkring 500 mikrogram pr. dag for kvæg og i området fra omkring 3 til omkring 150 mikrogram pr. dag for grise, geder og får. Mere foretrukne dosisområder er fra omkring 10 til omkring 100 mikrogram pr. dag for kvæg og fra omkring 3 til omkring 35 mikrogram pr. dag for grise, geder og får. De mest foretrukne dosisområder er fra omkring 50 til omkring 100 mikrogram pr. dag for kvæg og fra omkring 15 til omkring 35 mikrogram pr. dag for grise, geder og får. I almindelighed kan doseringen af østrogen med fordel være den samme som den, der regelmæssigt anvendes, når det pågældende østrogen indgives i form af et anabolisk middel.

Det vil være klart for fagfolk, at de optimale doser af GRF og østrogen for en given gruppe af dyr må bestemmes eksperimentelt, idet man hertil benytter den fundamentale praksis, som gælder inden for animalsk husdyrbrug.

Opfindelsen illustreres nærmere ved de følgende eksempler.

#### 30 EKSEMPEL 1

Væddere, der vejede omkring 32 kg, blev indespærret i metabolisme bure i omkring 7 dage, inden eksperimentet begyndte. Halvdelen af dyrene havde fået implanteret en si-

likonepolymer, som indeholdt østradiol, omkring 25 dage forud for eksperimentets begyndelse. Den implanterede polymer frigav omkring 25 mikrogram østradiol pr. dag under forsøgsperioden. To dage før starten af behandlingsprogrammet blev en kanyler, som var fremstillet af Silastic (Dow Corning Corporation), indført i hver halspulsåre på hvert dyr. Man udvalgte fire dyr, to implanterede og to ikke-implanterede, til tre GRF-behandlinger, nærmere bestemt 1,5 mg/dag, 0,33 mg/dag og kontrol. Den anvendte GRF var hGRF i syreform, syntetiseret ved fastfase-metodik i overensstemmelse med den generelle procedure beskrevet af Merrifield et al., Biochemistry 21, 5020 (1982).

Man infucerede GRF kontinuerligt igennem en af kanylerne i 5 dage, idet man anvendte en peristaltisk pumpe af fabrikatet Harvard. GRF blev fortyndet med fysiologisk saltvand til en sådan koncentration, at den faktiske afgivelse var 0,5 ml infusat pr. min.

Man udtog seks blodprøver fra hvert dyr pr. dag, idet man begyndte en dag forud for infusionens påbegyndelse og fortsatte i 1 dag efter dennes afslutning. Der blev udtaget to prøver i løbet af en time, nemlig umiddelbart forud for begyndelsen af hvert måltid ad libitum, som varede en time, og umiddelbart efter måltidets afslutning. Dyrene modtog to måltider af en times varighed med intervaller på 12 timer. Yderligere blodprøver blev udtaget en time før, umiddelbart før, 10 minutter efter og 60 minutter efter infusionens start. Ved afslutningen af infusionsperioden blev der udtaget yderligere blodprøver henholdsvis 10, 20, 30 og 60 minutter efter infusionens afslutning.



Blodprøverne blev opdelt i plasma og øvrige bestanddele, hvorefter der blev analyseret for væksthormon i plasma ved en standard-radioimmunologisk procedure.

- 5 Den efterfølgende tabel viser niveauerne af væksthormon i dyrene, idet de angivne værdier er middelværdier for samtlige analyser i den angivne tidsperiode. De data, som hidrører fra dyr, der var implanteret med østradiol, er angivet ved "+" i den kolonne, der er benævnt "østradiol".

10

TABEL 1

Behandling hGRF mg/dag	Østra- diol	For- be- hand- ling	Plasma GH ng/ml					Efterbe- handling
			Infusionsperiode (dage)					
			1	2	3	4	5	
kontrol	+	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

EKSEMPEL 2

- 15 Dette eksperiment blev gennemført på i det væsentlige samme måde som angivet i eksempel 1. I denne test blev der som GRF benyttet en hGRF-analog, som indeholdt serin i stedet for methionin i position 27. GRF'en var fremstillet ved rekombinant-metoder. Der anvendtes fire doseringer af hGRF, nemlig 0,75, 1,5 og 3,0 mg/dag samt kontrol. Til

hver hGRF-dosering anvendtes fire lam, hvoraf de to var implanteret med en østradiol-holdig polymer som beskrevet i eksempel 1.

- 5 Man infuserede hGRF i dyrene igennem en subkutan kanyle af mærket Silastic ved hjælp af en pumpe af mærket IVAC model 630 (IVAC Corporation, San Diego). Ved fortynding af hGRF med fysiologisk saltvand frembragte man sådanne koncentrationer, at det blev muligt at infusere 48 ml/dag af hvert
- 10 infusat i dyrene.

Fra hvert dyr blev udtaget blodprøver, som blev analyseret som beskrevet i eksempel 1, hvorved man fandt de følgende væksthormon-analysetal, som er anført i tabel II nedenfor

15 i samme form som anvendt i eksempel 1:

TABEL 1

Behandling hGRF mg/dag	Østra- diol	For- be- hand- ling	Plasma GH ng/ml					Efterbe- handling
			Infusionsperiode (dage)					
			1	2	3	4	5	
kontrol	+	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

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

-----

- 5 1. Fremgangsmåde til forøgelse af koncentrationen af endo-  
gent væksthormon i blodet hos et husdyr blandt kvæg, gri-  
se, får, geder, kameler og heste, k e n d e t e g -  
n e t ved, at man samtidigt indgiver synergistisk effek-  
tive mængder af et østrogen og en væksthormon-frigørende  
faktor.
- 10 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t  
ved, at dyrene er valgt blandt kvæg, grise og får.
- 15 3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t  
ved, at dyret er en okse.
- 20 4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t  
ved, at dyret er en malkeko.
- 25 5. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t  
ved, at den væksthormon-frigørende faktor er den okse-  
væksthormon-frigørende faktor.
- 30 6. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav,  
k e n d e t e g n e t ved, at østrogenet er østradiol  
eller et C<sub>1-6</sub>-alkanoat eller benzoat deraf.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t  
ved, at dyrene er grise, og at den væksthormon-frigørende  
faktor er den svinevæksthormon-frigørende faktor.