

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 162698 B

Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 6249/84  
(22) Indleveringsdag: 21 dec 1984  
(41) Alm. tilgængelig: 24 jun 1985  
(44) Fremlagt: 02 dec 1991  
(86) International ansøgning nr.: -  
(30) Prioritet: 23 dec 1983 HU 4457/83

(51) Int.Cl.5 A 61 K 37/38  
A 01 K 61/00

(71) Ansøger: \*Koezponti Valto- es Hitelbank RT. Innovacios Alap; 5-6., Szabadsag ter; Budapest X., HU  
(72) Opfinder: Tamas \*Gulyas; HU Aniko \*Horvath; HU Gyoergy \*Keri; HU Karoly \*Nikolics; HU Balazs \*Szoeko; HU Istvan \*Teplan; HU

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af til befrugtning egnede produkter fra fisk

kanoylamid-sidekæde,  
 $X_4$  betegner en glycinamid- eller  $C_{1-4}$ -alkylamidgruppe,

(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 4410514, 4530920, 4003884, 4075191

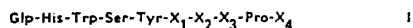
og salte eller metalcomplexer af disse forbindelser, til fisk i en dosis på fra 0,1 µg til 5 mg, og administration til fisk, som endnu ikke er modne til æglesning, af de ovenfor nævnte mængder i mindst 2, men højst 12 portioner, idet den sidst anvendte dosis er i det mindste den samme eller fortrinsvis mindst 1,5 gange højere end den forrige dosis.

(57) Sammendrag

Fremgangsmåden gør det muligt at udvinde modne konsprodukter, som er egnede til naturlig eller kunstig befrugtning, fra en hvilken som helst fiskeart inden for et hvilket som helst tidsrum uafhængigt af fiskenes naturlige gydningsæson.

6249-84

En fremgangsmåde til fremstilling af til befrugtning egnede produkter fra kønsmodne fisk i et tidsrum, som er uafhængigt af deres naturlige gydningsæson, idet det faktiske modningstrin bestemmes ved undersøgelse af kønsprodukter (sperma eller æg), fisk, som endnu ikke er modne til æglesning, adskilles fra de modne fisk, forbindelser med hormonal virkning administreres til fiskene, og der efter æglesningen fås konsprodukter fra fiskene eller fra deres omgivelser, omfatter administration af et nonapeptid- $C_{1-4}$ -alkylamid eller et decapeptidamid med den almene formel I



hvor

$X_1$  betegner glycyll eller en D-isomer af en hvilken som helst naturlig eller syntetisk aminosyregruppe,

$X_2$  betegner en L-aminosyregruppe med 1-4 carbonatomer i sidekæden, en L-phenylalanylgruppe eller en L-tryptophylgruppe,

$X_3$  betegner en L-aminosyregruppe med en  $C_{1-4}$ -alkyl- eller  $C_{2-4}$ -al-

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af til befrugtning egnede kønsprodukter fra kønsmodne fisk i et tidsrum uafhængigt af deres naturlige gydningssæson.

5 Det er kendt, at kønsaktiviteten hos fisk af begge køn reguleres af gonadotropinhormoner, som frigøres af adenohipofysen. Disse hormoner regulerer den morfologiske og funktionelle udvikling og modning af gonader, deres gametogenetiske aktivitet (produktion af æg og spermatozoer) (gonader) og udsondringen af gonadalhormoner.

10 Hos begge køn frigiver adenohipofysen de samme to gonadotropinhormoner. Et af dem kaldes FSH (follikel-stimulerende hormon), det andet kendes som LH (luteiniserende hormon) eller i henhold til dets virkning på hanindivider ICSH (interstitialcellestimulerende hormon).

15 Det er også kendt, at disse to hormoner ikke udviser nogen kønsspecificitet, eftersom det samme FSH er ansvarlig for den gametogenetiske aktivitet hos han- og hunindivider, og det samme LH eller ICSH inducerer udsondringen af androgen hos hanindivider og af østrogen eller progesteron hos hunindivider.

Både FSH og LH er glycoproteiner, som udviser en stærk artsspecificitet i fisk.

20 Hypofysen hos fisk integrerer funktionerne af det endokrine system, og den har også nogle koordinerende funktioner mellem det endokrine system og nervesystemet, hovedsageligt gennem kerner af det autonome nervesystem i hypothalamus-området af mellemhjernen. Herudover kontrollerer hypofysen reproduktionscyclusen ved hjælp af artsspecifikke tropiske hormoner.  
25

Under normale betingelser sker fisks ægløsning i et gydemiljø, som er karakteristisk for den pågældende fiskeart. Ægløsningen af modne æg sker ikke spontant, men æggene forbliver i en hviletilstand i et kortere eller længere tidsrum, indtil der udvikles passende betingelser. Denne reproduktive tilpasning, som er karakteristisk for fisk, kontrolleres af hypofysen og det centrale nervesystem i fællesskab. I  
30 hviletilstanden er fisks organisme afbalanceret på et niveau med lav

gonadotropinaktivitet, og der frigøres således kun en meget lille mængde gonadotropin til blodomløbet (N Berbilsky: Sowremennoe nostoianie woprosa o nevroghormonalny reguliacii polowo cyclu ryb i bioteknika gormonalnyh wozdiestwii w rybowodstwe, Leningrad, 1966, s. 8, udgivet af Gos. Univ.).

Det er umuligt at bestemme det nøjagtige tidspunkt, hvor gunstige betingelser for fisk forekommer, eftersom de udvikles i visse perioder mere eller mindre tilfældigt (fx sent forår eller tidlig sommer). Dette betyder, at den regulerende reproduktionsmekanisme hos fisk muliggør tilpasningen af den reproduktive cyklus til det ydre miljø. Denne regulering er hos fisk koordineret af hypothalamus/hypofysesystemet.

I henhold til de undersøgelser, som er blevet udført i de senere år, er det blevet erkendt, at frigørelsen af visse tropiske hormoner fra adenohipofysen reguleres af neurohormoner. Neurohormoner udskilles fra terminale nerver, som løber til visse kerner af hypothalamus, og absorberes straks af såkaldte portale kapillærkar, og på denne måde kommer de gennem blodet direkte til adenohipofysens vindinger.

Alle de hidtil kendte neurohormoner er oligopeptider eller polypeptider. Neurohormoner, som inducerer tropisk hormonudsondring, kaldes "afgivelsesfaktor" (RF), medens de hormoner, som inhiberer hormonudsondringen, kaldes "inhiberingsfaktor" (IF). I henhold til den seneste nomenklatur anvendes i tilfælde af neurohormoner med kendt struktur og funktion udtrykket "afgivelseshormon" (RH) eller "afgivelsesinhiberende hormon" (RIH).

Det er karakteristisk for alle neurohormoner, at deres virkning i hypofysectomiserede dyr er analog med den virkning, der iagttages efter administration af tropiske hormoner.

Basofili af fiskehypofyser udviser sæsonmæssige forandringer, og deres mængde aftager i gydningsperioden. Under processen med tilpasning til miljøet dannes der afgivelseshormoner (RH), som via blodomløbet kommer ind i hypofysen og dér regulerer afgivelsen af tropiske hormoner til blodet. På denne måde informeres fisk om tilvejebringelsen af

hensigtsmæssige ydre gydningsbetingelser. Som en konsekvens heraf aktiveres hypofysen og udsondringen af gonadotroper til blodet via det regulerende hormon af det luteiniserende hormon (LH/RH), og ægløsningsprocessen starter (B. Breton og Cl. Weil, *C.R. Acad. Sc.* 5 277, 1973, s. 2061-2064, Paris).

Følenerveimpulser, som fremkaldes af gydeområdet, overføres på denne måde til det endokrine system, og denne mekanisme aktiverer det reproduktive system - som har været i en obligatorisk hviletilstand - på det tidspunkt, hvor det optimale ydre miljø detekteres hvad angår 10 hensyn til overlevelsen af afkommet (*Gerbilsky, loc. cit.*).

Neurohormoner er i høj grad interspecifikke. Sekvensen af LH/RH hos fisk er forskellig fra sekvensen hos pattedyr, så de er ikke effektive, når de ombyttes.

Induceret kunstig formering af fisk er blevet gjort mulig ved opdagelsen og den verdensomspændende udbredelse af hypofyseteknikken 15 (*Gerbilsky, loc. cit.*).

Til hormonal induktion af ægløsningen anvendes hypofyser, som fås fra kønsmodne - eller næsten kønsmodne - almindelige karper efter hensigtsmæssig konservering. Andre hidtil afprøvede naturlige eller 20 syntetiske hormoner gav ingen entydigt positive resultater.

Da den almindelige karpe er almindeligt opdrættet, er der store lagre over hele verden, hvor hypofyser let kan fås i mængder, som er tilstrækkelige til produktionsformål. Hypofyser fra almindelig karpe kan med held anvendes til formeringen af adskillige opdrættede fiskearter. 25 Taxonomisk fjerne fiskearter (fx stør) er undtagelser, da der i dette tilfælde anvendes en hormonsuspension, som er fremstillet ud fra hypofyser af den samme art.

Indsamling og konservering af hypofyser udføres på samme måde uafhængigt af donorarten. Hypofyser bør udvindes fra ældre - om muligt 30 kønsmodne - fisk. Dette er kun meget sjældent muligt. Hypofysen er mindre i små fisk, så eftersom den doseres efter vægt, ville der i tilfælde af små fisk kræves betydelig flere donorfisk.

I henhold til den kendte fremgangsmåde dehydreres hypofyserne med acetone. Efter 3 x 8-12 timers nedsenkning i acetone bliver hypofyserne fri for vand og fedt. Efter hårdning tørres hypofyserne i 24 timer ved stuetemperatur, medens acetonen afdamper. Acetone er ikke  
5 skadelig for hypofysens aktive gonadotropinbestanddele, og hypofyser, som er tørret på den ovenfor beskrevne måde, kan lagres i længere tid uden tab.

For at aktivere gonadotropinhormonerne pulveriseres hypofyserne i en porcelænsmorter, og hormonerne opløses i fiskefysiologisk saltop-  
10 løsnings (0,65% NaCl).

Hormonopløsningen injiceres i fiskenes muskler, således at tilbageflydning eller andre tab undgås. I tilfælde af små fisk eller fisk med løse muskler administreres injektionerne til kropshulen. De injicerede hypofysehormoner spiller den samme rolle som fiskens egne  
15 hormoner, som afgives ved detekteringen af gydemiljøet; de fremkalder ægløsningsprocessen.

Selv om hypofyseteknikken er almindeligt anvendt i fiskeopdræt, er den ikke effektiv i alle tilfælde. Hovedårsagerne hertil er som følger:

20 a) Eftersom modningstrinet for donorfisk, hvorfra hypofyserne blev indsamlet, er ukendt, er hypofysernes gonadotropinhormonindhold også ukendt. Derfor er virkningen usikker, selv om doserne blev beregnet med vide grænser.

25 b) Hormoner fra hypofysen af almindelig karpe er kun virksomme i almindelige karper og i arter, som ikke er fjerne taxonomisk set. Derfor kan adskillige fiskearter, som er vigtige ud fra et økonomisk synspunkt, kun bringes til at formere sig med en lav effektivitet, eller de kan ikke bringes til at formere sig overhovedet.

30 c) Under anvendelse af hypofyser fra almindelig karpe (eller en hvilken som helst anden) er der kun blevet opnået LH-virkning under

kommercielle betingelser, og FSH-virkningen kan ikke fremkaldes på denne måde, sandsynligvis af de grunde, som er nævnt under a).

d) På grund af manglen på FSH-virkning kan hypofysation kun anvendes til induktion af fisk med æg, som er modne til ægløsning.

5 e) I tilfælde af hypofysation kan induceret kunstig formering kun udføres inden for den naturlige gydningssæson; dette betyder, at muligheden er begrænset til nogle få dage på et år. Anvendelsen af produktionsfaciliteter er derfor også begrænset.

10 f) Indsamling af hypofyser i store mængder kan kun udføres fra umodne fisk, hvis hypofyse er karakteriseret ved lav gonadotropinaktivitet. Indsamling fra modne fisk er kun mulig ved at dræbe værdifulde donor-fisk.

Opfindelsen angår tilvejebringelsen af en fremgangsmåde, som gør det muligt at opnå kønsprodukter fra en hvilken som helst kønsmoden  
15 fiskeart, hvilke kønsprodukter er egnede til naturlig eller kunstig befrugtning.

Opfindelsen er baseret på den erkendelse, at det ovenfor nævnte formål kan opnås fuldt ud, hvis nye gonadoliborinderivater administreres til modne fisks organisme. Det har vist sig, at FSH-LH/RH, som ud-  
20 sondres i fisks hypothalamus, med held kan erstattes af disse forbindelser, dvs. ved at injicere disse forbindelser kan udviklingen af sperma og æg og ægløsningen med held induceres.

Ifølge opfindelsen administreres som hormonal virkende decapeptidamider med den almene formel I

25  $\text{Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Phe-Leu-Gln-Pro-Gly-NH}_2$  I

og salte eller metalcomplexer af disse forbindelser til fisk i en dosis på fra 0,1  $\mu\text{g}$  til 5 mg, fortrinsvis 2-500  $\mu\text{g}$ , især 5-100  $\mu\text{g}$ , og i tilfælde af fisk, som endnu ikke er modne til ægløsning, administreres de ovenfor nævnte doser i mindst 2, men højst 12 portioner,

idet den sidst anvendte dosis er i det mindste den samme eller fortrinsvis mindst 1,5 gange højere end den forrige dosis.

De i formlen anvendte forkortelser er identiske med den nomenklatur, som er accepteret inden for peptidkemien, og som fx er offentliggjort i *J. Biol. Chem.* 241, 1966, s. 527 og 247, 1972, s. 977.

Forbindelsen er ikke-toxisk, så overdosering medfører ingen skadelige virkninger.

I tilfælde af behandling af fisk, som endnu ikke er modne til ægløsning, afhænger antallet af injektioner af, hvor lang den givne fisk er fra modningstrinet for ægløsning. Hvis det ønskede trin er nær, er antallet af injektioner lavere.

Fisk er modne til ægløsning, hvis spermaen i tilfælde af hanfisk bliver mobil, når den kommer i kontakt med vand, og i tilfælde af hunfisk, hvis kernen er beliggende på periferien af ægcellen.

Det er tilrådeligt at fremstille forbindelserne med den almene formel I, som anvendes ifølge fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse ved fastfaseteknikken af peptidsyntesen (R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 1963, s. 2149-2151). Afhængig af de ønskede forbindelsers struktur anvendes chlormethyleret polystyren-divinylbenzenharpiks med fordel i tilfælde af peptidalkylamid, og benzhydrylaminharpiks i tilfælde af peptidamid. Aminosyrerne forbindes med harpiksen i form af deres N- $\alpha$ -tert.butylloxycarbonyl (Boc)-derivater under anvendelse af dicyclohexylcarbodiimid (DCC)-, N,N'-diisopropylcarbodiimid (DIC)- eller aktiv ester-fremgangsmåden. Slutproduktet kan adskilles fra den faste bærer ved sure eller basiske fraspaltningsteknikker.

De ønskede slutprodukter med den almene formel I kan bygges op fra egnede beskyttede aminosyrer ved at anvende en passende kombination af trinvis syntese og fragmentkondensation, afhængig af de variable aminosyrebestanddeles kemiske karakter.

Hovedfordelene ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er som følger:

- a) Den gør det muligt at bringe fiskearter til at formere sig, som taxonomisk set er fjerne fra almindelig karpe, og som hidtil ikke er  
5 blevet bragt til formering på grund af manglen på artsspecifikke hypofyser.
- b) Den kan anvendes inden for vide økologiske grænser, fordi forbindelserne med den almene formel I udøver deres fysiologiske virkninger selv under meget forskellige biologiske betingelser.
- 10 c) Både formeringen af fisk uden for deres naturlige gydningssæson og samtidig den fulde udnyttelse af produktionsfaciliteterne bliver mulig.
- d) Fraværelsen af ægløsning på grund af unøjagtig hypofysedosering kan elimineres.
- 15 e) Den aktive bestanddel, som anvendes i fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan produceres syntetisk i laboratorier, hvorved usikkerheden af virkningerne, som er karakteristisk for den kendte hypofyseteknik, kan elimineres.
- f) Virkningen af det syntetiske hormon, som anvendes ved fremgangsmåden, er identisk med virkningen af afgivelsen af fiskenes egne gonadotropinhormoner.  
20
- g) Det syntetiske hormon, som anvendes i fremgangsmåden, er interspecifik, så det er virksomt selv i tilfælde af taxonomisk meget forskellige fisk.
- 25 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående, ikke-begrænsende eksempler.



## EKSEMPEL 1

Induceret kunstig formering af sterlet (*Acipenser ruthenus* L.).

Fra en population i givne omgivelser udvælges modne fisk, som derefter transporteres til formeringsstedet. Kønnene adskilles, og modningstrinet for æggene for hunfiskene bestemmes. Fiskene anses for at  
5 være modne til ægløsning, hvis kernen er beliggende på periferien af ægcellen. Sperma fra hanfisk undersøges ikke, da kønsprodukterne fra han- og hunfisk i populationen fra givne omgivelser er praktisk talt på samme modningstrin. Hvis fisk er modne til ægløsning, injiceres  
10 decapeptid med den almene formel I i en enkelt dosis på 70 µg hver i hver fisk, herunder hanfiskene.

Hvis fiskene ikke er modne til ægløsning, bør de holdes ved den naturlige gydningstemperatur, og den ovenfor nævnte forbindelse bør administreres i doser på 10 µg hver, i det mindste 2, men højst 12  
15 gange, så længe kernen fjerner sig fra centrum til periferien. Antallet af behandlinger afhænger af det faktiske modningstrin af kønsprodukterne i sammenligning med trinnet "modent til ægløsning". Denne modningsproces varer mindst 100, men højst 630 graddage i temperaturområdet 12-18°C (graddage betegner antallet af dage multi-  
20 pliceret med gennemsnitstemperaturen af det vand, som anvendes i modningsperioden).

Ægløsningen finder sted 24-32 timer efter administrationen af den sidste dosis. Derefter fås kønsprodukterne på 40-60 minutter.

## EKSEMPEL 2

25 Induceret kunstig formering af aborre (*Perca fluviatilis* L.)

Modne fisk udvælges fra en population og transporteres til formeringsstedet. Modningsgraden af kønsprodukterne bestemmes som beskrevet i eksempel 1, men kønnene adskilles ikke. Ægløsningsmodne hun- og hanfisk behandles med en enkeltdosis på 20 µg decapeptid med den  
30 almene formel I.

Fisk, som endnu ikke er modne til ægløsning, bør holdes ved den naturlige gydningstemperatur, og den ovenfor nævnte forbindelse bør administreres i doser på hver 2  $\mu$ g mindst 2, men højst 10 gange, så længe ægcellens kerne bevæger sig fra centrum til periferien. Antallet af behandlinger afhænger af det faktiske modningstrin af kønsprodukterne i sammenligning med trinnet "modent til ægløsning". Modningsprocessen varer mindst 100 graddage, i ekstreme tilfælde op til 400 graddage, i vandtemperaturintervallet 12-16°C.

Gydningen finder sted 24-36 timer efter administrationen af den sidste dosis. Aborrer kan let bringes til at gyde i tanke; i sådanne tilfælde er afstrygningen af kønsprodukterne ikke nødvendig.

#### EKSEMPEL 3

Induceret kunstig formering af hestemakrel (*Trachurus trachurus* L.)

Blandt hestemakreller, som er fanget levende i Adriaterhavet i november, transporteres individer med en længde på mindst 240 mm til formeringsstedet (fisk af denne størrelse er allerede kønsmodne). Forbindelsen med den almene formel I injiceres i hver fisk i en enkelt dosis på 10  $\mu$ g. Ægløsningen finder sted efter 24 timer ved en vandtemperatur på 18-24°C. Kønsprodukterne fås på 2 timer.

I tilfælde af hestemakrel er bestemmelsen af modningstrinnet og af køn unødvendig, da modne fisk er til rådighed i et praktisk talt ubegrænset antal.

#### EKSEMPEL 4

Induceret kunstig formering af gedde (*Esox lucius* L.)

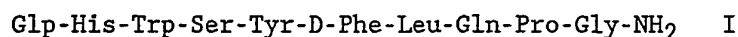
Kønsmodne fisk udvælges fra en population og transporteres til formeringsstedet. Kønnene adskilles, og modningstrinnet af kønsprodukterne bestemmes som beskrevet i eksempel 1. Ægløsningsmodne hun- og

hanfisk behandles med en enkeltdosis på 100  $\mu\text{g}$  decapeptid med den almene formel I.

Fisk, som endnu ikke er modne til ægløsning, bør holdes ved den naturlige gydningstemperatur, og den ovenfor nævnte forbindelse bør administreres i doser på hver 5  $\mu\text{g}$  mindst 2, men højst 10 gange, så længe ægcellens kerne bevæger sig fra centrum til periferien. Antallet af behandlinger afhænger af det faktiske modningstrin af kønsprodukterne i sammenligning med trinnet "modent til ægløsning". Modningsprocessen varer mindst 70, i ekstreme tilfælde op til 350, graddage ved en vandtemperatur på 8-14°C.

#### PATENTKRAV

Frengangsmåde til fremstilling af til befrugtning egnede produkter fra kønsmodne fisk i et tidsrum, som er uafhængigt af deres naturlige gydningssæson, idet det faktiske modningstrin bestemmes ved undersøgelse af kønsprodukter (sperma eller æg), fisk, som endnu ikke er modne til ægløsning, adskilles fra de modne fisk, forbindelser med hormonal virkning administreres til fiskene, og efter ægløsningen fås kønsprodukter fra fiskene eller fra deres omgivelser, k e n d e t e g n e t ved, at der som forbindelser med hormonal virkning administreres decapeptidamider med den almene formel I



og salte eller metalcomplexer af disse forbindelser, til fisk i en dosis på fra 0,1  $\mu\text{g}$  til 5 mg, fortrinsvis 2-500  $\mu\text{g}$ , især 5-100  $\mu\text{g}$ , og at der til fisk, som endnu ikke er modne til ægløsning, administreres de ovenfor nævnte mængder i mindst 2, men højst 12 portioner, idet den sidst anvendte dosis er i det mindste den samme eller fortrinsvis mindst 1,5 gange højere end den forrige dosis.