

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610008130.5

[51] Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61P 15/14 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010年1月6日

[11] 授权公告号 CN 100577200C

[22] 申请日 2006.2.21

[21] 申请号 200610008130.5

[73] 专利权人 北京大北农动物保健科技有限责任公司

地址 100083 北京市海淀区中关村大街27号中关村大厦1404房

[72] 发明人 胡松华 莫云 刘彤

[56] 参考文献

Evaluation of Lacticin 3147 and a Teat seal Containing ThisBacteriocin for Inhibition of Mastitis Pathogens. Maire P. Ryan, et al. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64 No. 6. 1998

乳酸链球菌素的研究现状. 贺家亮等. 中国食品添加剂, 第3期. 2004

审查员 陈中伟

权利要求书1页 说明书12页

[54] 发明名称

治疗奶牛乳房炎的药物制剂及其制备方法及其用途

[57] 摘要

本发明涉及一种用于治疗奶牛乳房炎的药物制剂及其制备方法。该制剂是一种含有乳酸链球菌素的无菌粉末，将其溶解于生理盐水后，即可用于乳房内灌注治疗奶牛乳房炎。本发明的优点和积极意义在于：(1) 粉剂比液体剂型更加稳定，可以在室温下长时间贮藏；(2) 该制剂用于治疗奶牛乳房炎，不会在牛奶中形成对人体有害的残留，用药后无停药期，无需弃奶；(3) 该制剂质量可控制，适合乳房内注入。

1、一种治疗奶牛乳房炎的药物制剂，其特征在于该制剂是一种含有乳酸链球菌素的无菌粉末，该粉末完全溶于 20 - 50 毫升的水或生理盐水时，乳酸链球菌素的效价为 10000-250000 单位/毫升，其溶液的 pH 值为 1-4。

2. 根据权利要求 1 所述的药物制剂，其特征在于其溶液的 pH 值为 2-3。

3、根据权利要求 1 所述的药物制剂，其特征在于所述的无菌粉末中含维生素 C、柠檬酸、苹果酸中的一种或几种，但不仅限于这几种酸。

4、一种如权利要求 1 所述的治疗奶牛乳房炎的药物制剂的制备方法，其特征在于包括如下步骤：用无菌方法将乳酸链球菌素和维生素 C、柠檬酸、苹果酸中的一种或几种酸混合，该混合粉末完全溶解于 20 ~ 50 毫升的水或生理盐水时，乳酸链球菌素的效价为 10000-250000 单位/毫升，溶液的 pH 值为 2-3。

治疗奶牛乳房炎的药物制剂及其制备方法及应用

技术领域

本发明涉及一种药物制剂及其制备方法，以及该药物制剂用于制备治疗奶牛乳房炎药物的用途。

背景技术

乳腺炎是危害奶牛养殖业最严重的一类疾病。全世界约有 50% 的奶牛患各种类型的乳腺炎。患乳腺炎的奶牛，奶产量和质量下降。美国每年因奶牛乳腺炎造成的直接经济损失达 20 亿美元。奶牛乳腺炎造成的损失约 70% 是由隐性乳腺炎引起的产奶量下降，中国每年仅隐性乳腺炎造成的损失至少是 1.35 亿元人民币。引起奶牛乳房炎的主要原因是病原微生物感染。因此，目前治疗乳房炎的主要药物是抗生素。由于抗生素长期、广泛、大剂量用于治疗奶牛疾病已经导致一系列不良后果。首先是食品公共卫生问题：用抗生素治疗之后，潜在着牛奶中药物残留的危险，对人的健康产生不利影响；其次是耐药菌株增加：致病菌产生耐药性，使乳房炎变得越来越难治愈，牧场兽医不得不加大抗生素的使用剂量，这又加重药物残留的危险；药残的其他危害还包括乳制品生产中的发酵过程受到抑制，导致产品的产量和质量降低。因此，长期以来人们一直在寻找比抗生素更加安全有效的奶牛乳腺炎治疗药物。

有关这方面的研究，目前以中草药和溶菌酶等制剂较多。

在长期的实践中，中兽医学对防治奶牛乳腺炎积累了丰富的临床经验及大量的中草药方剂，但这些方剂的有效成分及其含量不确定，质量难以得到有效控制；传统中草药直接采用原药材，用药量大，药效不显著；而且草药成分复杂，应用于乳房内灌注，具有刺激性。

溶菌酶能通过裂解细胞壁，溶解及杀灭多种致病菌，以达到防治疾病的目的。但酶的渗透作用不强，当细菌在乳腺组织深部或寄生在细胞内时，溶菌酶是没有作用的。另外酶制剂的稳定性较差，质量不易控制。

根据报道，1970年 Gross 和 Morell 阐明了乳酸链球菌素 (Nisin) 分子的结构。Nisin 是一种新型低聚肽，存在 6 种类型，分别为 A、B、C、D、E 和 Z。其中对 Nisin A 和 Nisin Z 两种类型的研究最活跃，两者仅在 27 位氨基酸残基有差别，其抗菌特性几乎无差别。Nisin 一级结构由 34 个氨基酸组成，分子末端有氨基和羧基，还有 5 个硫桥构成内环，其分子式是 $C_{143}H_{228}N_{42}O_{37}S_7$ ，平均分子量为 3510。Nisin 活性分子常为二聚体和四聚体，分子量分别为 7000 和 14000。

Nisin 对微生物的作用机理有大量研究，Nisin 能吸附 G^+ 菌的细胞膜，然后在细胞膜上形成空洞，使胞内物质排出，导致细胞解体死亡。Nisin 主要抑制大部分 G^+ 菌的生长。常见的奶牛乳房炎致病菌主要是 G^+ 菌，如金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、停乳链球菌和乳房链球菌等，研究表明，Nisin 对这些致病菌的活性很高，而且对耐青霉素的致病菌也有较强的杀灭作用。

Nisin 是乳制品中所含的天然产物，若干年来，它随着食品被人们摄入，并没发现毒性问题。现在已对 Nisin 的安全性问题进行了系统的研究，大鼠经口服 LD50 约为 7000mg / kg 体重。研究表明，Nisin 对蛋白水解酶（如胰蛋白酶等）特别敏感，因此食用后在消化道中即可很快被蛋白水解酶水解成氨基酸。人在摄入 10min 后，在唾液中就检测不到 Nisin 的活性，故不会在体内残留，也不会改变肠道正常菌群，是一种安全的防腐剂。1969 年 FAO / WHO 食品添加剂联合专家委员会批准 Nisin 作为食品添加剂使用；1990 年 3 月 29 日我国卫生部将其列入 GB2760 - 86 的 1990 年增补品种中，可用于罐藏食品、植物蛋白食品、乳制品和肉制品。目前已有 50 多个国家和地区批准 Nisin

可以作为一种纯天然食品防腐剂使用。

美国专利 US5762948 和中国专利 CN1186413 公开了一种预防和治疗奶牛乳腺炎的湿巾，其成分为乳酸链球菌素。但该制剂仅能用于奶牛乳区外部的消毒，并不能用于乳房内注射，中国专利 CN03115388 公开了一种用于预防奶牛乳腺炎的杀菌制剂，其主要成分为一种合成的抗菌肽和溶葡萄球菌酶，但目前尚未有任何国家批准将该抗菌肽用于奶牛乳房炎治疗。我们前期申报了用乳酸链球菌素制成乳房灌注液用于治疗奶牛乳房炎的国家发明专利，但我们的后来研究发现乳酸链球菌素的水溶液贮藏数月后，抗菌效价会大幅度下降。

发明内容

本发明的目的是提供一种稳定且便于临床应用，无残留的用于治疗奶牛乳房炎的以 Nisin 为主要成分的药物制剂。

本发明的另一个目的是提供上述药物制剂的制备方法。

用于治疗奶牛乳房炎的药物制剂按如下方法制备：

用无菌方法将乳酸链球菌素和维生素 C、柠檬酸或者苹果酸或者几种酸混合，制备成一种无菌的粉末。

该混合粉末完全溶解于 20~50 毫升的水或生理盐水时，乳酸链球菌素的效价为 10000-250000 单位/毫升，溶液的 pH 值为 2-3。

本发明的再一目的在于提供该药物制剂用于制备治疗奶牛乳房炎药物的用途。

本发明的 Nisin 粉剂的优点和积极效果在于：（1）本发明的 Nisin 粉剂在常温下保存一年，效价不会显著降低；（2）由于粉剂含维生素 C 等酸性物质，在水或者生理盐水中，Nisin 很容易溶解，便于临床应用；（3）制剂的主要成分是乳酸链球菌素，用于治疗奶牛乳房炎，不会在牛奶中形成对人体有害的残留，治疗之后无停药期，无需弃奶。

具体实施方式

关于“乳酸链球菌素的效价”的说明：“乳酸链球菌素的效价”

用于衡量 Nisin 抗菌活性的大小，用国际单位表示。WHO 的生物标准化专家委员会（The World Health Organization Expert Committee in Biological Standardization）规定了一种标准物质，每克该物质含纯品 Nisin 25 毫克，相当于 100 万国际单位。在检测 Nisin 活性时，用该标准物质作为对照品。

实施例 1: 制备效价为 300 万单位/瓶的乳酸链球菌素粉剂的方法包括如下步骤:

(1) 以无菌操作方法将 10 克维生素 C 和 10 克效价为 15000 单位/毫克乳酸链球菌素充分混合;

(2) 将 (1) 中的混合粉末，以每份 400 毫克，用无菌操作方法分装于 50 个容量为 5~20 毫升的灭菌玻璃安瓿中，即得。

实施例 2: 制备效价为 200 万单位/瓶的乳酸链球菌素粉剂的方法包括如下步骤:

(1) 以无菌操作方法将 14 克维生素 C 和 10 克效价为 15000 单位/毫克的乳酸链球菌素充分混合;

(2) 将 (1) 中的混合粉末，以每份 320 毫克，用无菌操作方法分装于 75 个容量为 5~20 毫升的灭菌玻璃安瓿中，即得。

实施例 3: 制备效价为 400 万单位/瓶的乳酸链球菌素粉剂的方法包括如下步骤:

(1) 以无菌操作方法将 100 克维生素 C 和 100 克效价为 20000 单位/毫克的乳酸链球菌素充分混合;

(2) 将 (1) 中的混合粉末，以每份 400 毫克，用无菌操作方法分装于 500 个容量为 5~20 毫升的灭菌玻璃安瓿中，即得。

实施例 4: 制备效价为 400 万单位/瓶的乳酸链球菌素粉剂的方法包括如下步骤:

(1) 以无菌操作方法将 100 克柠檬酸和 100 克效价为 20000 单位/毫克的乳酸链球菌素充分混合;

(2) 将(1)中的混合粉末,以每份400毫克,用无菌操作方法分装于500个容量为5~20毫升的灭菌玻璃安瓿中,即得。

实施例 5: 制备效价为400万单位/瓶的乳酸链球菌素粉剂的方法包括如下步骤:

(1) 以无菌操作方法将100克苹果酸和100克效价为20000单位/毫克的乳酸链球菌素充分混合;

(2) 将(1)中的混合粉末,以每份400毫克,用无菌操作方法分装于500个容量为5~20毫升的灭菌玻璃安瓿中,即得。

观察例 1 不同 Nisin 乳房炎灌注剂的稳定性观察

(一) 实验目的

观察不同 nisin 乳房灌注剂 1 号、2 号、3 号和 4 号在 4℃, 25℃ 和室温下贮藏的稳定性。

表 1. 不同乳房灌注剂配方

编号	成分	剂型
1 号	盐酸+ nisin +蒸馏水	液体剂型
2 号	维生素 Vc + nisin +蒸馏水	液体剂型
3 号	柠檬酸+ nisin +蒸馏水	液体剂型
4 号	维生素 Vc + nisin	粉剂

(二) 贮藏条件

将上述四种配方的样品分别置于温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 4°C 及室温(即放置室内)下进行考察,当月考察一次后,逐月考察一次,3 个月后每 3 个月考察一次,共考察 2 年。

(三) 检测项目及方法

检测项目: nisin 效价、pH 值。

检测方法: 根据国标 GB2760-86 乳酸链球菌素效价检查方法检测 nisin

效价, 用普通 pH 计检测溶液 PH 值。

(四) 考察结果

表 2. 各配方的 PH 值

剂 型 时间	1 号			2 号	3 号	4 号		
	4℃	25℃	室温	4℃	4℃	4℃	25℃	室温
0 月	2.21	2.21	2.21	2.64	2.50	2.78	2.78	2.78
1 月	2.36	2.42	2.35	2.52	2.86	2.65	2.82	2.69
2 月	2.78	2.24	2.23	3.06	3.59	2.71	2.72	2.72
3 月	2.24	2.35	2.30	3.64	3.94	2.71	2.74	2.74
6 月	3.65	4.36	2.46	3.42	4.42	2.68	2.71	2.78

表 3. 各配方的效价 (单位: IU/ml)

剂 型 时间	1 号			2 号	3 号	4 号		
	4℃	25℃	室温	4℃	4℃	4℃	25℃	室温
0 月	99771	99771	99771	88348	90082	72125	72125	72125
1 月	85688	73983	51828	58239	68377	70392	68392	69586
2 月	82097	70984	47904	66444	57313	71657	68631	69595
3 月	61005	59963	46714	62303	55284	71447	70756	70950
6 月	59103	59063	46285	47793	46152	69960	66158	69534

（五）结论

粉剂无论是 PH 值还是效价在三种保存条件下都较稳定，而液体剂型无论采用何种助溶剂，都存在 nisin 效价降低，PH 值升高不稳定的现象，揭示粉剂在各种制剂中性质最稳定。

观察例 2 Nisin 乳房炎灌注剂治疗奶牛临床型乳房炎的疗效观察

1 材料与方法

1.1 试验药物

乳房灌注2号（粉针）

试验牧场常规抗生素制剂：均为市售产品。

1.2 试验动物及其分组

杭州市近郊奶牛场临床型乳房炎自然发病病例54头，分为试验组和对照组。

1.3 试验方案

1.3.1 治疗前 无菌操作采集患病乳区奶样，进行细菌分离鉴定。

具体操作程序如下：

①奶样接种血琼脂平板，37℃恒温培养24h~48h，观察细菌生长情况并进行菌落计数。

②挑取疑似致病菌的单个菌落接种普通肉汤，37℃恒温培养18~24h，观察细菌生长情况。

③对步骤②中的肉汤培养物涂片、革兰氏染色镜检。

④根据以上3步的结果可以初步判定细菌的种属：葡萄球菌、链球菌、肠杆菌。

⑤肉汤培养物接种于营养琼脂平板，37℃恒温培养24h后进行生化鉴定，按照有关文献判定细菌种类。

1.3.2 治疗实验 试验组乳房内灌注乳房灌注2号，1瓶/次，2次/天；注射前用20mL灭菌生理盐水溶解，摇匀。对照组用牧场常规抗生素药物进行治疗，主要有青霉素、链霉素、庆大霉素、红霉素和磺胺嘧啶。

1.3.3 治疗后 治疗后第1、2周，对试验组和对照组奶牛乳区无菌操作采集奶样，分别进行HMT（杭州奶牛乳房炎诊断试剂）检测、牛奶体细胞计数和细菌学检查。

1.3.4 药敏试验 对奶样中分离到的金黄色葡萄球菌，用青霉素G药敏纸片（批号20040218，为杭州天和微生物试剂有限公司产品）进行药敏试验。

1.4 判定标准

1.4.1 治疗效果判定标准

①完全治愈：患病乳区红肿热痛等临床症状完全消失，泌乳基本恢复正常，奶样中未检出致病菌；

②临床治愈：患病乳区红肿热痛等临床症状完全消失，泌乳基本恢复正常，奶样中可检出致病菌；

③无效：患病乳区临床症状无明显改善或加重，或者治疗后两周内再次发病，两者均视为无效。

1.4.2 奶样HMT检测结果判定标准

① 阴性（-）：均匀混和，不出现任何沉淀；

② 可疑（±）：有微量沉淀出现，摇动后消失；

- ③ 弱阳性 (+)：有少量沉淀出现，摇动后消失；
- ④ 阳性 (++)：有多量胶状出现，摇动后向中心凝集；
- ⑤ 强阳性 (+++)：迅速形成胶状沉淀，摇动时中心凸起，粘着盘底。

2 结果和讨论

2.1 Nisin 治疗乳房炎的临床治愈率高于常规抗生素 结果见表 1。用乳房灌注 2 号治疗 39 头奶牛 (43 个乳区)，平均每个乳区治疗次数 3.8 次，用药后未发现不良反应，完全治愈 23 个乳区，治愈率 53.5%，临床治愈 38 个乳区，临床治愈率 88.4%；对照组治疗 15 头 (19 个乳区)，平均每个乳区治疗次数 5.1 次，完全治愈 10 个乳区，治愈率 52.6%，临床治愈 12 个乳区，临床治愈率 63.2%。经统计学分析，两组的治愈率无显著性差异 ($P>0.05$)，但试验组的临床治愈率显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表 1 临床型乳房炎治疗结果

药物	乳区数	平均治疗次数	完全治愈		临床治愈	
			乳区数	治愈率 (%)	乳区数	临床治愈率 (%)
乳房灌注 2 号	43	3.8	23	53.5	38	88.4
常规抗生素	19	5.1	10	52.6	12	63.2

2.2 感染乳区治疗前后的细菌学变化 对 43 个感染了细菌的乳区在治疗前和治疗后 1、2 周进行奶样细菌学检查，其中试验组 32 个乳区，对照组 11 个乳区，见表 2。试验组的细菌转阴率低于对照组，其原因可能是用 nisin 治疗的病例临床症状消失快，很快停止用药，治

疗次数少（平均 3.8 次），但致病菌并未从患病乳区清除。

表 2 治疗前后检出细菌的乳区数

细菌	治疗后周数					
	试验组			对照组		
	0*	1	2	0*	1	2
无乳链球菌	14	4	4	7	2	1
金黄色葡萄球菌	6	4	4	1	1	1
CNS	4	6	4	1	0	0
G ⁻ 杆菌	2	1	0	0	0	0
G ⁺ 杆菌	1	0	0	0	0	0
停乳链球菌	2	0	0	1	0	0
无乳链球菌和 CNS 混合感染	1	0	0	0	0	0
停乳链球菌和 CNS 混合感染	1	0	0	0	0	0
停乳链球菌和金黄色葡萄球菌混合感染	2	0	0	1	0	0
合计	32	15	12	11	3	2

*为治疗前检查。

2.3 治疗后奶样杭州乳房炎诊断试剂检测结果 见表 3。两组阳性（++）和强阳性（+++）乳区比例无显著差异。

表 3 治疗后乳区奶样隐性乳房炎检查结果，单位：检测乳区数（%）

HMT 等级	试验组		对照组	
	1 周	2 周	1 周	2 周
-	10 (27.8)	6 (16.7)	1 (8.3)	2 (16.7)
±	2 (5.6)	4 (11.1)	1 (8.3)	1 (8.3)
+	2 (5.6)	3 (8.3)	1 (8.3)	2 (16.7)
++	5 (13.9)	5 (13.9)	0 (0)	0 (0)
+++	17 (47.2)	18 (50.0)	9* (75.0)	7 (53.3)

*其中有 2 个乳区出现临床型乳房炎。

2.4 治疗后奶样体细胞数 (SCC) 检测结果 见表 4。两组体细胞含量在 50 万/毫升以上的乳区比例无显著差异。

表 4 治疗后乳区奶样体细胞数检测结果, 单位: 检测乳区数 (%)

体细胞数 ($\times 10^4$ 个/mL)	试验组		对照组	
	1 周	2 周	1 周	2 周
0~50	15 (41.7 %)	13 (36.1 %)	3 (25%)	5 (41.7%)
50~100	3 (8.3%)	7 (19.4%)	2 (16.7%)	0
>100	18 (50%)	16 (44.4 %)	7* (58.3 %)	7 (58.3%)
合计	36	36	12	12

*其中有 2 个乳区出现临床型乳房炎; 括号内表示占总治疗乳区的百分数。

2.5 青霉素 G 敏感性试验 对分离到的金黄色葡萄球菌进行青霉素 G

药敏试验,结果显示:所有分离到的金黄色葡萄球菌对青霉素均耐药。

3 结论

用 nisin 治疗奶牛临床型乳房炎,临床治愈率高于用常规抗生素治疗,但在清除致病菌和降低牛奶体细胞数方面,两者无多大差异。