

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利说明书

A61K 9/14

A61K 38/43

A61K 47/00

[21] ZL 专利号 87106794.3

[45]授权公告日 1997年9月10日

[11] 授权公告号 CN 1035801C

[22]申请日 87.8.26 [24]颁证日 97.6.21

[21]申请号 87106794.3

[30]优先权

[32]86.8.28 [33]AU[31]PH 07715/8

[73]专利权人 恩萨科尔资产有限公司

地址 英国海峡群岛泽西

[72]发明人 索马斯·科·萨·英格

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所

代理人 顾柏棣

[56]参考文献

US3803304

US4079125

US4447412

<<药剂学>>南京药学院P739

审查员 赵喜元

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 对动物肠部释放生物活性物质的微粒制
剂的制备方法

[57]摘要

一种生产微粒制剂的方法，该方法包括步骤：

(a) 将一种或多种生物活性物质固定于凝胶基质中，(b) 将固定化生物活性分子制成微粒，(c) 用明胶或其它水溶性物质的膜包封微粒，和 (d) 用一种不溶于酸，但溶于碱或肠液的聚合物或用含 C₁₂-C₂₄ 脂肪酸的高分子量聚合物包被步骤 (c) 的微粒

权 利 要 求 书

1.一种生产微粒制剂的方法，该方法包括步骤：

(a)将一种或多种生物活性物质固定于凝胶基质中，

(b)将固定化生物活性分子制成微粒；

(c)用明胶或其它水溶性物质的膜包封微粒，和

(d)用一种不溶于酸，但溶于碱或肠液的聚合物或用含 $C_{12} - C_{24}$ 脂肪酸的聚甲基丙烯酸丁酯的高分子量聚合物包被步骤(c)的微粒。

2.权利要求1所述的方法，其中凝胶基质由K-角叉藻聚糖、明胶、藻酸盐、纤维素或其衍生物或能够形成凝胶的合成聚合物构成。

3.权利要求1或2所述的方法，其中由步骤(d)获得的微粒尺寸在 $50 - 500\mu\text{m}$ 之间。

4.权利要求1所述的方法，其中生物活性物质选自医用及兽医用化合物、酶、维生素、蛋白质、疫苗或氨基酸。

5.权利要求4所述的方法，其中生物活性物质包括：铁、锌或钾盐、维生素 B_{12} 、核黄素、蛋氨酸、 β -半乳糖苷酶或菠萝蛋白酶。

6.权利要求1所述的方法，其中聚合物是乙酸邻苯二甲酸纤维素。

说 明 书

对动物肠部释放生物活性物质的微粒制剂的制备方法

本发明涉及对动物肠部释放生物活性物质的微粒制剂的制备方法。

由消化道吸收生物活性物质主要在肠内进行。

许多生物活性物质是酸不稳定的，而且暴露在酸性条件中会变性，或者发生化学改性，以致失去活性。当生物活性微粒经口腔给动物服用时会产生问题，许多需通过胃的医用化合物和兽医用化合物即是例子。

动物的胃部，由于胃膜中壁细胞所产生的氢离子而呈高酸性。胃部的pH可能低到1 pH单位。因此，许多生物学化合物在到达进行吸收的肠部之前不可逆地发生变性、变异及/或破坏。

许多有效的治疗化合物和必要无机物对胃有刺激。尤其是，阿斯匹林、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 K^{+} 、在口服时对胃产生刺激。该刺激能引起胃膜形成溃疡。这一缺点抵消了这些化合物的治疗优点。

动物体内由于遗传障碍或胰腺疾病而引起的消化酶缺乏或者不平衡，可口服酶来治疗。然而，这些酶中的许多酶对酸不稳定，而且在到达肠部之前就在胃的酸性区不可逆地变性。因此，必须给以大剂量的酶，致使疗效低而费用昂贵。

生物活性物质在经过反刍动物的瘤胃时经受碱性pH条件而常常变性。这也对成功地使用口服治疗剂起着阻碍作用。

本发明的目的在于提供一种对动物肠道释放生物活性物质的制剂和方法，该制剂消除或显著减少由于胃部酸性条件或瘤胃碱性条件而引起的生物活性损失。

按照本发明的一个方面，提供了一种微粒制剂，该制剂有一个含一种或多种固着形式生物活性物质的药心，该药心被包封在一种水溶性膜内并涂一层肠溶层，该层含有碱溶、酸不溶的聚合物或一种高分子量聚合物，该聚合物的结构取代有或者含有脂肪酸或其他能被肠液溶解物质的窗孔。

生物活性物质指医用化合物及兽医化合物；酶，如 β -半乳糖苷酶和菠萝蛋白酶；维生素，如维生素 B_{12} ；金属离子，如 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 K^+ ；抗生素、抗菌素及其医药容许的盐；蛋白质、疫苗、氨基酸及其微生物。

“固着形式”指生物活性物质被固定在凝胶状物质中，包封在半渗透膜内、吸收到吸收剂上或者与螯合剂键合。

生物活性物质举例来说，可用下列任何方法来固着：

(a) 夹裹法—将生物活性物质掺入凝胶状物质心部或包封在半渗透膜内；

(b) 交联法—利用交联剂使生物活性物质形成分子间交联；或

(c) 载体键合法—借助离子键及/或共价键使生物活性物质与水溶性物质产生物理或化学键合。

固着需进行得使生物活性物质在固着或释放时均保持活性。

可通过生物活性物质同一定条件下能形成凝胶的物质混合，将生物活性物质夹裹在心部，以使生物活性物质夹裹在所形成的凝胶基质中。凝胶形成剂的例子包括 κ -角叉藻聚糖、藻酸、明胶、纤维素或其衍生物、或者各种能形成凝胶的合成聚合物，例如聚酰胺或脱乙酰壳多糖。

如果使用吸收剂，则以微粒活性炭为佳。

如果使用螯合剂的话，可包括乙二胺四乙酸（EDTA），乙二胺四乙酸盐或其衍生物，或者能在水溶液中或含水/亲水溶剂中解离其离子键的高分子量盐。

包封包括在药心上沉积一层可使每颗微粒的药心与其周围环境物理隔离的薄膜或化学阻挡层。该膜或阻挡层是水溶性的。形成合适阻挡层的化合物例子是明胶。

肠溶层以乙酸邻苯二甲酸纤维素为佳。但是，任何其他耐酸、碱溶的聚合物均可采用。

甲基丙烯酸丁酯或其他高分子量聚合物可取代有或含有硬脂酸或其他任何脂肪酸衍生物，或者其他能被胆汁溶解物质的窗孔。脂肪酸以含C₁₂—₂₄为佳。

生物活性物质在凝胶中固着是最为有利的特点。特别是，凝胶基质限制了变性剂，例如涂覆肠溶层（一种酸不溶、碱溶的膜，如乙酸邻苯二甲酸纤维素）时所用各种有机溶剂的可及性。因而固着在凝胶基质中的大部分生物活性物质最终可用于催化作用或其他作用。

生物活性物质固着在其中的凝胶基质是多孔和可渗透的。因此，当凝胶暴露在含水条件，例如十二指肠的环境中时，凝胶由于肠液渗入凝胶基质而膨胀，而生物活性物质则被释放并由凝胶中透出起催化作用或其他作用。

按照本发明的实施例可制造大约50—500 μm的粒度很小的微粒。尤其是，固着在凝胶或能形成凝胶的溶液中的生物活性物质易于处理和加工，并可经细心加工过程生产所需的小粒度微粒。例如，一种含有生物活性物质的凝胶可挤过很小孔径的筛子，或者可经冷冻干燥而形成所需粒度的颗粒。作为选择，在能形成凝胶的溶液中生物

活性物质可经由适宜的喷嘴喷成细液滴，细液滴通入使之成为凝胶的溶液中，从而使生物活性物质固着在所形成的凝胶基质中。如此形成的微粒粒度由喷嘴的微孔尺寸和溶液雾化时的压力决定。但是，用现有技术中的方法不能得到这些结果。在现有技术中，生物活性物质，如酶仅与常规的粘合剂混合，这些粘合剂不能经上述处理而产生所需粒度的微粒。

小粒度微粒最为理想，因为它们可均匀地分布于饲料中并在它们到达肠内时，由于微粒具有扩大的表面积，而使生物活性物质迅速释放。

药心外围的水溶性阻挡层防止了在肠溶层涂覆过程中由所用有机溶剂引起的变性。由于上述凝胶基质的保护性，故可有效保持生物活性物质的生物活性。

本发明微粒制剂可防止对pH敏感的生物活性物质在胃或瘤胃中失活，而在肠道，特别在十二指肠中起作用。当微粒制剂到达单胃动物肠部的碱性部位时，外层被溶解，或者脂肪酸窗孔被消化。于是肠液就能通过水溶性涂层，使涂层软化，露出药心，药心膨胀并释放出生物活性物质。

在反刍动物中，高分子量聚合物，例如含脂肪酸窗孔的甲基丙烯酸丁酯适于作外涂层，并使微粒制剂能通过瘤胃和胃。在肠道中，尤其在十二指肠中，脂肪酸窗孔被脂肪酶消化掉，从而使水溶性涂层软化并露出药心，使药心膨胀并释放出生物活性物质。

正如熟练的专业人员会不难理解的那样，水溶性膜和碱溶性聚合物或者被脂肪酸或类似的乳化物质所间断的高分子量聚合物的涂层厚度和药心尺寸决定生物活性物质到达的比率，而且又决定生物活性物质到达肠内的部位。

按照本发明的另一方面，提供如上所述的、其中药心含有 β -半乳糖苷酶的微粒制剂。这种微粒制剂可用作预先断奶动物，特别是预先断奶的仔猪的生长促进剂。此外，该制剂可用来治疗仔猪的腹泻。

母猪奶中所存在的碳水化合物主要是乳糖。乳糖需要消化成单糖，即葡萄糖和半乳糖才能由肠道下部吸收。如果使用上述微粒剂剂向肠道始端补充额外的 β -半乳糖苷酶，母猪奶可消化得更完全，而使仔猪增重。

仔猪、人（表现为乳糖不容）或其他动物缺乏 β -半乳糖苷酶，可服上述含 β -半乳糖苷酶的微粒制剂来治疗。从而在肠中释放出 β -半乳糖苷酶，促进乳糖消化。

肠道下部未消化的乳糖形成结肠菌增殖和发酵的理想培养物，产生气体和乳酸。这导致水样酸性腹泻。这种情况就是通常所说的家畜腹泻。严重腹泻可导致体液损失和电解质不平衡，而引起脱水和死亡。

治疗腹泻的另一种本发明范围内的方法是使用含有蛋白酶，如菠萝蛋白酶的本发明微粒制剂。菠萝蛋白酶在小肠中释放，使致病微生物脱离肠受体，从而减轻腹泻。

按照本发明的另一个方面，提供一种增进预先断奶动物，特别是仔猪生长的方法，该方法包括服有效量的如上所述的微粒制剂，该制剂的药心含有固着形式的 β -半乳糖苷酶。

按照本发明的又一个方面，提供一种治疗仔猪腹泻的方法，该方法包括服有效治疗量的前述微粒制剂，该制剂的药心含有 β -半乳糖苷酶或蛋白酶，如菠萝蛋白酶。

本发明可特别用来给动物，包括人服用酸不稳定物质，例如维生素 B_{12} 及核黄素。

另外，在使用本发明的微粒制剂时，可安全地向动物，包括人投给引起胃刺激的物质，如阿斯匹林或铁。从而这些物质在到达肠道碱性部位之前不暴露在消化道中。

按照本发明的又一方面，提供一种防止酸敏生物活性物质在胃或瘤胃中受到破坏及/或不失活的方法，该方法包括服一种微粒制剂，该制剂具有一个含一种或一种以上固着形式生物活性物质的药心，该药心被包封在一种水溶性膜中，并或涂覆一种碱溶、酸不溶的聚合物，或涂覆一种高分子量聚合物，该聚合物的结构取代有或者含有脂肪酸或其他能被肠液溶解物质的窗孔。

人或动物可结合医药上或兽医上容许的载体或赋形剂口服本发明的微粒制剂，例如该微粒制剂可同水、高岭土、滑石、碳酸钙、乳糖、氯化钠、硫酸铜、硫酸锌、硫酸亚铁、硫酸镁、碘化钾、硫、氯化钾、硒及/或维生素，如生物素、氯化胆碱、烟酰胺、叶酸或维生素A、D₃、E、K、B₁、B₂、B₆及B₁₂一起投药。

该微粒制剂可以水状酸性溶液、悬浮液、片剂或胶囊形式、糊剂或与食物或饲料相结合投药。

适宜的动物饲料例子包括一种或一种以上的下列饲料：玉米、麦麸、大豆粉、鱼粉、草粉、脱脂乳、磷酸三钙、麦芽、谷粒、大米、高粱、乳清、或者 α -粗粉。

按照本发明的又一方面，提供一种生产上述微粒制剂的方法，该方法包括下列步骤：

- (a) 将一种或一种以上生物活性物质固着在药心中。
- (b) 使固着的生物活性物质微粒化，
- (c) 用水溶性物理阻挡层包封微粒，以及

(d) 将步骤(c)制得的微粒或涂覆碱溶、酸不溶聚合物,或涂覆其结构取代有或者含有脂肪酸或其他能被肠液溶解的物质窗孔的高分子量聚合物。

最好给微粒喷涂步骤(c)的水溶性物理阻挡层和步骤(d)的涂层。

参照下列实施例及附图仅作为例子来阐明本发明,附图中,

图1示出仔猪经菠萝蛋白酶治疗后的腹泻严重程度散点图;以及

图2示出仔猪未经治疗的腹泻严重程度散点图。

实施例1

本发明微粒制剂的制造方法

(a) 将2—5% (重量/体积)的κ-角叉藻聚糖与纯化水在65°C下混合,直至κ-角叉藻聚糖全部溶解。将该溶液冷却至50°C。

(b) 将1% (重量/体积)的生物活性物质在50°C时溶于pH 6的等渗磷酸盐缓冲液(40% 0.067M NaH_2PO_4 + 60% 0.067M NaHPO_4)中。将该溶液加入溶液(a)中并在500 Hz下均匀化15分钟。然后将2—5% (重量/体积)于水中离子化的钙加入该溶液,并将所得溶液在50 Hz下再均匀化1小时,然后冷却至20°C,就形成一种凝胶,液胞珠(liquid cell beads)及一种含水相。

(c) 将所得的凝胶、液胞珠和含水相冷至5°C,滗出上清液,过滤并冷冻干燥。将冷冻干燥的物质磨碎成25—100 μm的粒度,然后用凝固剂,例如2.5% (重量比)戊二醛或福尔马林洗涤。

用另一种方法,将步骤(b)的凝胶相挤压并以3千磅/厘米²

喷过 $50\ \mu\text{m}$ 大小的微孔并下滴 $1-5\ \text{m}$ ，落入凝固剂，例如 2.5% （重量比）的戊二醛或福尔马林中，于是形成颗粒。

(d) 然后将这些颗粒过滤并用软化剂，如甘油洗涤。任何膜层软化剂均可使用。

(e) 将所得的颗粒过滤，用高速气流输送并于 $40\ ^\circ\text{C}$ 热干燥。

(f) 将上述步骤的颗粒在 $40\ ^\circ\text{C}$ 喷涂 $1-2\%$ （重量/体积）明胶水溶液。

(g) 然后在颗粒上喷涂一种耐酸的碱溶性涂层。该涂层含有：

6% （重量比）乙酸邻苯二甲酸纤维素

30% （重量比）异丙醇

0.5% （重量比）蓖麻油

及丙酮至 100% （重量比）。

(h) 作为步骤 (g) 的替代步骤，将一种高分子量的、其结构为一种脂肪酸膜或类似可乳化物膜所中断的聚合物喷涂到颗粒表面上，直到最终重量为 105% （重量比）。涂层含有：

3% （重量比）甲基丙烯酸丁酯

0.5% （重量比）邻苯二甲酸二丁酯

0.05% （重量比）硬脂酸

及以乙酸乙酯至 100% （重量比）。

在步骤 (a) 中， κ -角叉藻聚糖可用任何凝胶剂，例如藻酸、明胶、纤维素或其衍生物来代替。

在步骤 (b) 中，钙可用任何其他碱金属离子代替，例如 K^+ 、 Rb^{2+} 、 Cs^+ 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 或者二价或三价金属离子，例如 Al^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 等，或者 NH_4^+ 离子或

脂肪胺或芳香二胺，例如三乙基胺、甲二胺、乙胺、六亚甲基二胺等。

实例例 2

含维生素 B₂ (核黄素) 微粒制剂

制造方法:

1. 将 7 5 0 0 mg 英国药典级核黄素与 5 0 0 0 ml 0.3% 冰醋酸溶液混合。在水浴中加热并摇晃，直至全溶。

2. 将 2 5 0 g K-角叉藻聚糖在 6 5 °C 与 5 0 0 0 ml 纯化水混合，直至角叉藻糖全溶，将该溶液冷却到 5 0 °C，然后与核黄素溶液混合。

3. 然后将所得的凝胶/溶液以每分钟 5 0 0 转均匀化 1 5 分钟。

4. 将 5 l 10% 氯化钙蒸馏水溶液加入凝胶/溶液中，然后将其以每分钟 5 0 转均匀化 1 小时。冷却 5 °C 并滗出凝胶相。

5 (a). 将滗出的 1 0 0 g 凝胶冷冻干燥并使之颗粒化，以产生约 1 0 0 μg 的微粒。

5 (b). 过滤凝胶相的剩余部分并以 3 千磅/厘米² 经 5 0 μm 大小的微孔，从 3 m 高度喷入 2.5% 戊二醛中。

6. 过滤 5 (b) 的微粒并用 0.5% 甘油水溶液洗涤。过滤所得的微粒，用高速气流输送并在 4 0 °C 热干燥。收集所有颗粒。

7. 将上一步骤的微粒在 4 0 °C 喷涂 2% 明胶水溶液，直到最终重量为 1 0 4 % (重量比)。

8. 然后将微粒喷涂 3% 甲基丙烯酸丁酯、0.15% 邻苯二甲酸二丁酯、0.05% 硬脂酸的乙酸乙酯溶液，直至最终重量为 1 0 5 % (重量比)。

9. 将微粒过筛，以使微粒的平均尺寸小于 5 0 0 μm。

试验微粒：

体外试验：

1. 将 5 g “试验微粒”和 5 g “对比微粒”分别置于 6 cm × 6 cm 的尼龙布袋中。
2. 密封布袋并在 pH 1 的稀盐酸溶液中浸 2 小时。同时以每分钟 60 转进行搅拌。
3. 然后将布袋从酸液中取出，在流动水中漂洗 30 分钟并滴干。
4. 经一头瘦奶牛的切口收集 200 ml 瘤胃液。
5. 将两只试验袋悬浮于瘤胃液中并在 37 °C 培养 24 小时。
6. 冲洗两个布袋，然后在 40 °C 干燥。
7. 称每 5 袋内物质的重量并分析核黄素含量。

结果

尼龙布袋中没有留下对比微粒。

从含有试验微粒的尼龙布袋中回收到 4.52 g 试验微粒。损失的 0.48 g 试验微粒可能是由于在制造过程中未完全成形的微粒破碎所致。

由以 1 g 瘤胃液处理过的试验微粒的分析结果算出，袋中的 4.52 g 试验微粒含有总量为 114 mg 的核黄素。4.52 g 未处理过的微粒含有大约 114 mg 核黄素。

将 2 g 试验微粒重新装入一只尼龙袋中并悬浮于 100 ml 从一家屠宰场采集的十二指肠液中，并于 37 °C 培养。微粒在 2 小时内破碎。

分析方法

1. 将经瘤胃液处理过的试验微粒倒入 100 ml 乙酸乙酯水溶液

(50% / 50%) 中并以每分钟 500 转均匀化 1 小时。

2. 倒出溶液相，留下水相。

3. 重复三次该步骤。

4. 然后将 3 ml 冰醋酸加入最终的水相中。将混合物在水浴中加热，频繁摇晃，直到全溶。用 1 号瓦特曼滤纸过滤并稀释到 1000 ml。加入 5 ml 0.1 M 醋酸钠并将所得的溶液用水稀释到 5.0 ml。测定所得溶液的吸收率，最大值约在 444 nm 处。以 323 作为约 444 nm 的最大值处的 A 值 (1% 1 cm)，计算核黄素含量。

实施例 3

含蛋氨酸的微粒制剂

制造方法：

含蛋氨酸的微粒用实施例 2 的方法来制造，但步骤 1 中使用的 30 g 食用级 DL-蛋氨酸除外，以下将含蛋氨酸的微粒称作“试验微粒”。“对比微粒”按实施例 2 的方法形成。

体外试验：

1. 将 5 g “试验微粒”和 5 g “对比微粒”各装入 6 cm × 6 cm 的尼龙袋中。

2. 将布袋密封并在 pH 为 1 的稀盐酸溶液中浸 2 小时，并以每分钟 60 转搅拌。

3. 将布袋从酸液中取出并用流动水漂洗 30 分钟，然后滴干。

4. 经一头瘦母牛的切口采集 200 ml 瘤胃液。

5. 将两只布袋悬浮于瘤胃液中，并于 37 °C 培养 24 小时。

6. 洗涤这两只布袋并于 40 °C 进行干燥。

7. 称袋中物质的重量并分析蛋氨酸含量。

结果:

在尼龙袋中没有剩下对比微粒。

从装有试验微粒的尼龙布袋中回收到 4.40 g 试验微粒。损失的 0.6 g 试验微粒大概是由于不合格微粒破损之故。

从 1 g 经瘤胃液处理过的试验微粒的分析结果计算出, 4.40 g 试验微粒的蛋氨酸总含量为 563 mg, 4.4 g 未处理过的微粒含 536 mg 蛋氨酸。

将 2 g 试验微粒再装入一只尼龙袋中并悬浮于从一家屠宰场采集来的 100 ml 十二指肠液中, 在 37 °C 培养。2 小时内发现微粒破碎。

分析方法:

1. 将经瘤胃液处理过的试验微粒倒入 500 ml 带塞玻璃烧瓶中, 加入 200 ml 乙酸乙酯水溶液 (50% / 50%) 并以每分钟 500 转均匀化 1 小时。

2. 倒出溶剂相, 保留水相。

3. 重复三次该步骤。

4. 加水使最终的水相成 20 ml。将 10 g 磷酸二氢钾, 4 g 磷酸一氢钾及 4 g 碘化钾加入其中并充分混合至全溶。

5. 加入整 100 ml 0.1 N 碘, 盖上瓶塞, 充分混合并静置 30 分钟, 然后用 0.1 N 硫代硫酸钠滴定过量的碘。进行空白测定和必需的校正。0.1 N 的每毫升碘相当于 7.461 mg DL-蛋氨酸。

实施例 4

预断奶仔猪的生长促进

给仔猪服用 2 ml 含

维生素 B ₁	5 mg
维生素 B ₂	2 mg
维生素 B ₆	8 mg
维生素 B ₃	8 mg

的糊剂和药心中含 β -半乳糖苷酶(300 F. C. C. LU)的本发明微粒制剂。

在出生当天和出生第五天服糊剂。

仔猪经上述处理后比未处理过的仔猪体重明显增加。此外,服用微粒制剂的仔猪腹泻发生率大大降低。

实施例 5

仔猪腹泻的防治

带 K 8 8 菌毛(K 8 8⁺ E. coli)大肠埃希氏杆菌(E. coli)是引起部分猪初生期和断奶后腹泻的主要原因。这类菌在引起疾病之前必需与肠受体结合。

体外试验已表明,蛋白酸菠萝蛋白酶对降低肠(糖蛋白)K 8 8 受体的 K 8 8 结合活性极为有效。该受体仅在 K 8 8 敏感表现型的猪肠粘膜表面上出现。

该试验阐明了本发明微粒制剂对治疗仔猪腹泻的效力。

方法:

猪:

从 Werribee 动物研究所购得三头交配过的小母猪。用胶囊试验(Chandler, 1986)测定小母猪的 K 8 8 表型。发现一头

(# 6 5 G) 是强 K 8 8 - 粘着 (对传染敏感), 一头 (# 2 6 4 Y) 是弱 K 8 8 - 粘着, 而一头 (# 2 1 9 Y) 是 K 8 8 - 不粘着。这些母猪的产仔数分别为 7、7 及 9。

这些小母猪在三天内前后产仔, 而仔猪约在 3 周龄期断奶。任意从头两窝各选出四头仔猪, 从剩下的一窝中选出五头仔猪, 每天用本发明的含菠萝蛋白酶 (0.04% 重量比) 的微粒制剂处理。其他所有的仔猪不予处理。

处理:

将含菠萝蛋白酶的微粒制剂以低 pH 的羧甲基纤维素缓冲剂, 用一支 10 ml 注射器口服给药 (2 g/剂)。菠萝蛋白酶处理在喂食前 1—2 小时进行。第一剂菠萝蛋白酶在断奶前一天给药, 并在以后连续 8 天给药。

接种:

每头仔猪每天进行 5 菌株 K 8 8⁺ E. coli 的大量接种 (约 5×10^9 E. coli/日)。从 K 8 8 大肠杆菌病致死病例中分离出 4 个菌株。这些菌株均为血清组 0 1 4 9。它们自分离出来后已经冻干保存 1—5 年。其余的 K 8 8⁺ E. coli 是最近从本地猪 (血清组 0, 无法分类) 的不致命腹泻病例分离出来的。将细菌从绵羊血琼脂 (50% 体积比) 悬浮到磷酸盐缓冲的盐水 (PBS, pH 7.2) 中。仔猪直接在喂食之前用细菌进行口腔接种。

腹泻评定

仔猪的健康或传染程度用下列方法来评定:

(i) 活重: 每头猪喂食前称取活重, 在从断奶到屠宰的 3 周中进行 17 次。

(i i) 腹泻: 动物临床状况的主观评定如下:

正常: 无腹泻或脱水症状。

溏便 (loose) : 粪便较正常明显稀。无脱水迹象。

腹泻: 粪便稀和量过多。

重腹泻: 腹泻, 伴有虚弱和脱水迹现。

死亡: —

(i i i) 细菌传染: 溶血 (hly⁺) 菌菌落的比率显然在排泄物涂到绵羊血琼脂上进行测定。

K 8 8 表现型的评定

在尸体剖验时从小母猪曾与其交配的公猪采集中肠刮下物。同样, 借助作出一个在尸体剖验时沿小肠所得的 5 个等距离点的粘着图评定母猪和小猪的表现型。仔猪断奶后四周被屠宰。肠刮下物的 K 8 8 表现型用酶免疫测定 (KPELA , Chandler 等, 1986 年) 来评定。

结果

在 K 8 8⁺ E. coli 接种后, 严重腹泻 (和死亡) 仅明显在对 K 8 8 粘着表现型母猪 (# 6 5 G) 所产的仔猪中发生。尽管这窝仔猪可能是杂合体 (即仅载有单个显性基因供 K 8 8 受体表现), 但它们均同样为 K 8 8 - 粘着型。弱粘着性母猪 (# 2 6 4 Y) 所产仔猪的受体活性是可变的, 但比母猪 # 6 5 G 所产仔猪要小。K 8 8 - 不粘着母猪 (# 2 1 9 Y) 所产仔猪也是 K 8 8 - 不粘着。

表明腹泻日评定和同窝小猪的散点图如图 2 a (以菠萝蛋白酶处理的仔猪) 及图 2 b (未经处理的仔猪) 。在用菠萝蛋白酶处理的仔猪中, 腹泻的发病率和严重程度看来都低, 尽管每组都有一头仔猪在

断奶后的24小时内死去。这些仔猪均产自母猪#65G。“腹泻”或严重腹泻的记录出现在处理/接种期内，其中九次是未接受菠萝蛋白酶处理的仔猪。在菠萝蛋白酶处理过的组中，仅在接种/处理结束后腹泻才变得更明显些。

已发现通过用直肠拭子取下来的化验标本的涂片上 H_{1y}^+ 菌落比例评定仔猪的传染程度是用处不大的，可能是因为每天大量接种而导致明显不受影响的仔猪中 H_{1y}^+ 菌落比例高。生物可能在这些仔猪的大肠中移地发育，这是它们造成危害小的地方。

同样，每天增加的活重对评定因菠萝蛋白酶可能有的好处也无大用处。在低遗传敏感性的仔猪中（由母猪#264Y及#219Y所产的同胎仔猪）中所观察到的暂时腹泻对活重增加的影响不大。

敏感母猪（#65G）的仔猪，正如预料的那样，受细菌侵害的影响较为严重。每个处理组均有一头仔猪死亡，而未处理组只有两头仔猪存活。这些仔猪中的一头仔猪的增重严重地受细菌侵害的影响，另一头不受影响。以菠萝蛋白酶处理的三头仔猪都没有严重受到细菌的侵害影响。

实验表明，K88受体的活性可在体内在断奶前及在断奶后可能引起传染的那一周经口腔接种含菠萝蛋白酶的微粒来改变。这种微粒制剂看来似乎减轻这种腹泻的临床症状。

我们进行的另一些试验表明，以本发明含菠萝蛋白酶的微粒制剂处理的仔猪与未处理的仔猪相比，腹泻发病率降低28%。

这种防治大肠杆菌病的途径可提供一种在密集猪群中使用抗生素的选择方法。由于每年约有一千万头猪死于大肠杆菌病（Walters及Sellwood，1986年）因此用含蛋白酶的微粒进行治疗，对

养猪业来说可能是极有利的。

上述试验使用了蛋白酶菠萝蛋白酶。虽然我们的试验已表明菠萝蛋白酶是使K 8 8受体退化的最有效蛋白酶，但须了解其他蛋白酶。蛋白酶或起破坏或改变糖蛋白作用的酶的组合物也可用于本发明的这一方面。其他可用的蛋白酶的例子有胰蛋白酶、真菌蛋白酶P 2 3、枯草杆菌蛋白酶、蛋白酶K，以及其他真菌蛋白酶和细菌蛋白酶。

许多其他病原菌是已知的或被认为是与肠受体结合的。这类细菌的例子有沙门氏菌、志贺氏杆菌及链球菌。

包封在本发明微粒制剂中的蛋白酶可用于治疗动物和人的带有这类细菌的传染病。

参 考 文 献

Chandler , D. S. (1986年), 猪对K 8 8⁺ 大肠埃希氏杆菌的遗传抵抗力, 为获得自然科学博士学位的论文, La Trobe 大学。

Chandler , D. S. , Chandler , H. M. , Lube , R. K. J. , Tzipori , S. R. 及Craven , J. A. (1986年), 用酶免疫测定筛选K 8 8 -不粘着表现型猪肠, Vet. Microbiol . 11 : 153 — 161.

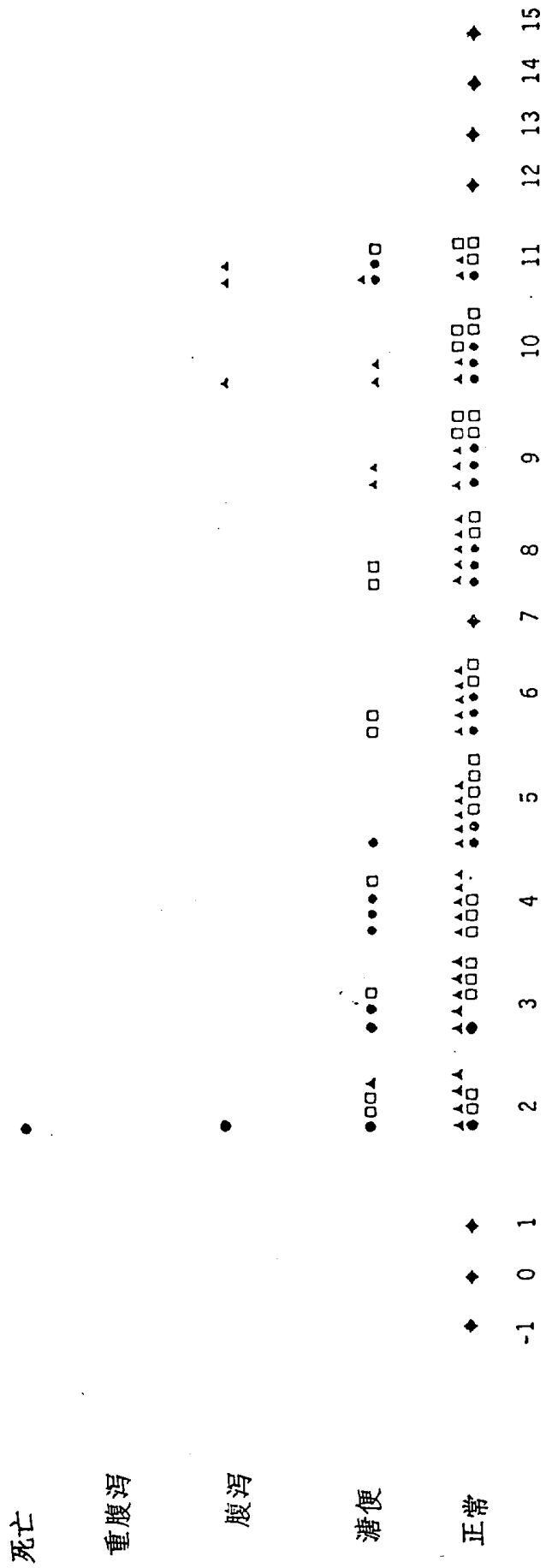
Kidder , D. E. 及Manners , M. J. (1978年), 猪的消化, Scientifica , Bristol , U. K. .

Walters , J. R. 及Sellwood , R. (1984年), 猪对K 8 8⁺大肠埃希氏杆菌的遗传抵抗性能, 英国动物生产学会会刊, Scarborough , U. K. . 论文编号76, 3月26—28日。

说 明 书 附 图

图 1: 仔猪经菠萝蛋白酶治疗后腹泻严重程度的日评定散点图

● 母猪 # 650 所产的仔猪
 □ 母猪 # 264 所产的仔猪
 ▲ 母猪 # 221 所产的仔猪
 ◆ 所有仔猪, 所有各窝仔猪, 均同

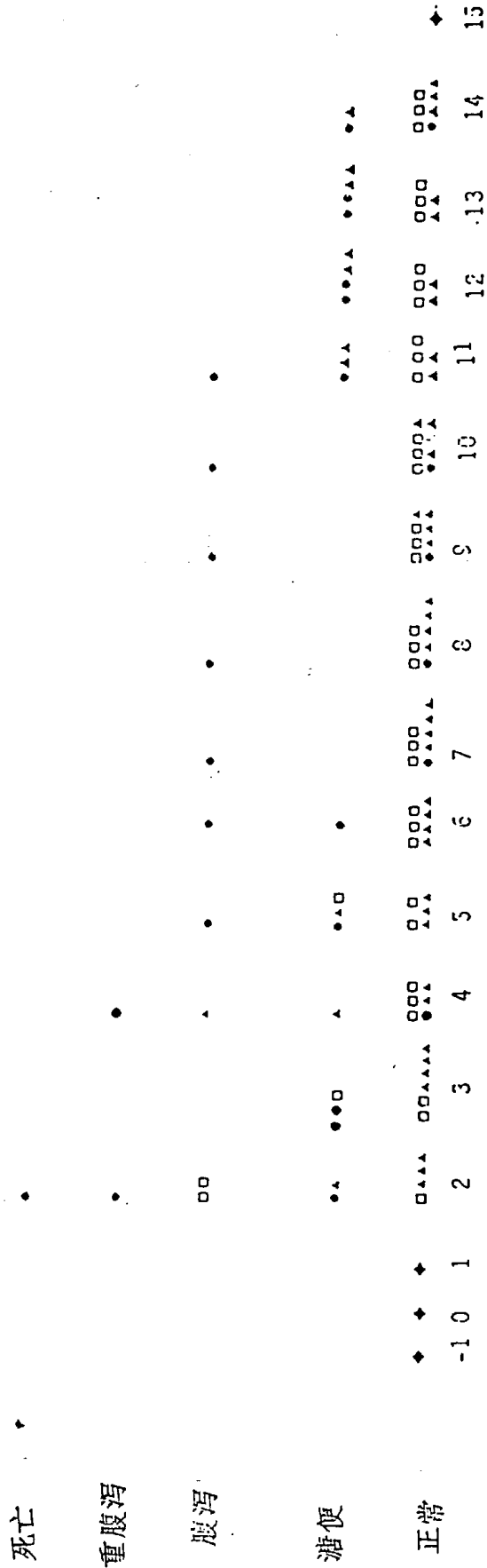


断奶后天数

图 2: 未处理仔猪腹泻严重程度日评散点图

● 母猪 # 6 5 0 所产的仔猪
 □ 母猪 # 2 6 4 Y 所产的仔猪
 ▲ 母猪 # 2 2 1 9 Y 所产的仔猪
 ◆ 所有仔猪, 所有各窝仔猪, 均同

← 接种期 →



断奶后天数

临床观察