(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106998749 A
(43)申请公布日 2017.08.01

(21)申请号 201580045389.4

(22)申请日 2015.08.24

(30)优先权数据
62/041,175 2014.08.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.02.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/046509 2015.08.24

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/032944 EN 2016.03.03

(71)申请人 安纳塔拉生命科学有限公司
地址 澳大利亚昆士兰州

(72)发明人 特蕾西·L·迈诺特
约翰·沃尔什

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
A23K 20/189(2016.01)

权利要求书1页 说明书16页 附图4页
按照条约第19条修改的权利要求书1页

(54)发明名称

避免抗微生物剂抗性的抗腹泻制剂

(57)摘要

菠萝蛋白酶的口服制剂，可有效治疗并预防由病原微生物引起的腹泻。这种制剂并不杀灭病原微生物，并且因此不会有助于抗微生物剂抗性生物的增殖。本发明需要配制菠萝蛋白酶、Blanose羧甲基纤维素钠、无水柠檬酸、Epikuron 135F卵磷脂油和亚乙基二次氮基四乙酸二钠盐二水合物(“EDTA”)的水性口服悬浮液。

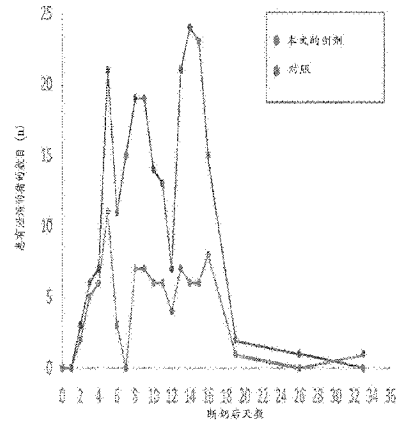


图3--组仔猪在断奶时（第0天）给予单一口服剂量（4 mL）的本文的制剂，或未经处理（对照）。本文的制剂显著地降低了腹泻的发生率（$P < 0.05$）。

CN 106998749 A

1.口服兽用制剂,包含抗腹泻有效量的菠萝蛋白酶,基本上不含肠溶聚合物。

2.口服兽用制剂,包含抗腹泻有效量的菠萝蛋白酶,基本上不含邻苯二甲酸酯。

3.如权利要求2所述的口服兽用制剂,其中所述邻苯二甲酸酯包括邻苯二甲酸乙酸纤维素。

4.口服兽用制剂,包含抗腹泻有效量的菠萝蛋白酶以及螯合剂。

5.如权利要求4所述的口服兽用制剂,其中所述螯合剂包括EDTA。

6.口服兽用制剂,包含抗腹泻有效量的菠萝蛋白酶以及有效于改进所述菠萝蛋白酶在水中的溶解度的量的乳化剂。

7.如权利要求6所述的口服兽用制剂,所述乳化剂包括卵磷脂。

8.如权利要求7所述的口服兽用制剂,进一步包含柠檬酸。

9.抗腹泻口服剂型,包含羧甲基纤维素。

10.如权利要求9所述的剂型,进一步包含菠萝蛋白酶。

11.如权利要求10所述的剂型,其中所述口服剂型是饮品或口服灌药。

12.如权利要求10所述的剂型,其中所述剂型是兽用剂型。

13.用于在人类、动物或鱼中预防抗微生物剂抗性的病原肠道微生物的增殖的方法,所述方法包括:(a)鉴定易受病原肠道微生物的感染的人、动物或鱼,并且然后(b)向所述人、动物或鱼口服给予有效于预防所述人、动物或鱼由于所述病原肠道微生物而发生腹泻的量的菠萝蛋白酶,借此所述人、动物或鱼不再易受所述病原肠道微生物的感染,借此不给予所述人、动物或鱼抗微生物有效量的抗微生物剂以治疗或预防由所述病原肠道细菌造成的腹泻。

14.用于在人类、动物或鱼中预防病原肠道微生物的增殖的方法,所述方法包括:(a)鉴定易受病原肠道微生物的感染的人、动物或鱼,并且然后(b)向所述人、动物或鱼口服给予有效于预防所述人、动物或鱼由于所述病原肠道微生物而发生疾病的量的菠萝蛋白酶,借此所述人、动物或鱼不再易受所述病原肠道微生物的感染,借此不给予所述人、动物或鱼抗微生物有效量的抗微生物剂以治疗或预防由所述病原肠道微生物造成的所述感染。

15.如权利要求2所述的剂型,其中所述剂型是动物饲料。

避免抗微生物剂抗性的抗腹泻制剂

[0001] 政府利益：

[0002] 无

[0003] 相关申请：

[0004] 本申请要求来自2014年8月25日提交的美国临时专利申请序列号62/041175的优先权，将其内容通过引用而特此结合。

[0005] 背景：

[0006] 腹泻是在猪和人类中的问题。仔猪中的泄泻(腹泻)是在养猪业中最常见的问题之一，影响全球每年出生的16亿头仔猪中的数亿头。它可以导致降低的增重、高治疗成本、以及频繁死亡。在早期健康受挫的仔猪倾向于在后期依然保持一定的体重和性能缺点。因此，泄泻不仅对仔猪健康具有不利影响，而且对农业收益具有不利影响。

[0007] 腹泻在人类中也是显著的问题。它是发展中国家中的第二大死因，每年杀死多于150万儿童并且是营养不良的首要原因。估计在五岁以下的儿童中每年发生大约40亿例腹泻。腹泻还是到发展中地区的旅行者的显著问题，每年影响4千万人，并且是军事人员在作战期间的主要问题。

[0008] 有许多不同的原因导致腹泻。产肠毒素大肠杆菌(ETEC)是在未断奶的以及刚断奶的仔猪中泄泻的最常见原因之一。其他重要的病原体包括轮状病毒以及由原生动物猪等孢球虫引起的球虫病，并且主要影响在生命前三周中的仔猪。在与ETEC的共感染中观察到由球虫病引起的高死亡率。

[0009] ETEC还是在发展中国家中的幼儿中腹泻的最常见原因之一，并且相比于其他引起腹泻的病原体，与较高的死亡风险相关联。ETEC也是在到发展中地区的旅行者中腹泻的最普遍的原因，在一些情况下具有高达70％的罹患率。在发展中国家中影响五岁以下的儿童的其他重要病原体包括轮状病毒、隐孢子虫属、志贺氏菌属、气单胞菌属、O1群霍乱弧菌和弯曲菌属。肠聚集性大肠杆菌(EAEC)、志贺氏菌属、弯曲菌属、沙门氏菌属、气单胞菌属、邻单胞菌属、以及非霍乱弧菌是旅行者腹泻的其他重要原因。

[0010] 如上这些同样的病原体、以及肠出血性大肠杆菌(EHEC，或产志贺毒素大肠杆菌STEC)、李斯特菌属、耶尔森菌属、环孢子虫属、贾第虫属、杯状病毒和其他肠道病毒还在美国引起腹泻。艰难梭菌是医院内获得性感染的主要原因。总之，这些因子在美国每年造成大于2亿例的腹泻。在许多情况下，并非总是感染因子是致因。例如，在感染HIV的患者和癌症患者中，腹泻可以作为化疗的慢性副作用的结果。腹泻还可以是内分泌肿瘤、糖尿病或慢性炎症(如在患有炎症性肠病的患者中)诱发的激素失调的结果。

[0011] 所有的引起腹泻的病原体在其诱发的临床症状、发病机制、毒力以及流行病学方面中有明显不同。一些病原体例如ETEC是非侵袭性的，并且通过经由特异性粘附因子附着至小肠上的肠上皮细胞受体上并通过产生肠毒素而诱发腹泻。其他病原体例如志贺氏菌属是侵袭性的，并且通过诱发吸收性表面的炎症或缺失以及吸收不良而改变肠屏障功能并诱发腹泻。这种多样性给正尝试设计简单且有效的对抗所有腹泻致因的预防或治疗的研究者带来了艰巨任务。

[0012] 尽管存在病原体多样性并且存在许多诱发腹泻的因素，但细菌毒素或炎症介质诱发腹泻的最常见致因。毒素典型地触发信号传导分子例如环AMP、环GMP或胞内Ca^{2+}，它们进而激活肠道氯离子(Cl^-)通道，导致Cl^-的分泌增加并且从而导致流体分泌。当流体分泌的水平增加超过结肠重吸收从小肠失去的水和电解质的能力时，腹泻发生，这可以导致严重的脱水和最终死亡。化疗剂和炎症因子也通过激活这些信号传导分子而诱发腹泻。参见图1。预期靶向这些环核苷酸或钙信号传导通路的药剂是抗分泌药剂，并因此是有效的广谱抗腹泻药。

[0013] 病原细菌例如大肠杆菌的摄入可以在人类中引起腹泻，并在猪中引起泄泻。在常常需要密集或拥挤的生长条件的现代养猪业中，泄泻受到特别关注。

[0014] 抗生素是用以治疗人类腹泻和猪泄泻的有效手段。在养殖中，还可以将抗生素日常添加至动物饲料中以预防性地防止泄泻。然而，规律且广泛的抗生素使用已经使得病原细菌的抗生素抗性株得以增殖。

[0015] 因此，在本领域中对于用以治疗并预防人类腹泻和猪泄泻同时不促进病原细菌的抗生素抗性株的进一步增殖的方式存在需要。

[0016] 本文发现了一种方式。本文的方案并不杀灭病原细菌；因此在字面的常规意义上不是“抗生的”，并且不会选择性地有利于抗生素抗性细菌的增殖。而是，本文的方案仅预防病原细菌粘附至胃肠道的内层。无法粘附至胃肠道的内层，病原细菌穿过宿主动物的完好的胃肠道，并且排除于宿主动物的粪便中。本文的方案还针对其他引起腹泻的微生物例如病毒和寄生虫有效。这是通过阻断侵入和肠细胞内的分泌途径而非通过尝试杀灭或靶向引起腹泻的微生物来实现的。本文的方案不是有毒的，并且不产生有毒的代谢物或残余物；因此适合用于人类和食用动物(例如猪、牛和家禽)以及水产业(例如，养殖的鱼和贝类)中。所述方案还可用于伴侣动物(例如狗和猫)、观赏鱼等中。本文在所附权利要求书中使用术语“兽用”以涵盖食用动物、伴侣动物和鱼。另外，所述方案可以使用标准的工业多肽合成技术(例如Fmoc树脂合成)来合成，而且可以可替代地从某些植物提取物来生产。

[0017] 附图简要说明：

[0018] 图1图示了腹泻的若干可能原因。

[0019] 图2图示了本文制剂的三种可能作用机制。

[0020] 图3示出了与未处理的仔猪相比，在单次给予本文制剂之后患有泄泻的断奶后仔猪的数目随时间变化的图表。

[0021] 图4示出了与未处理的仔猪相比，在单次给予本文制剂之后断奶后仔猪的总临床分数随时间变化的图表。

[0022] 详细说明：

[0023] 本发明需要配制菠萝蛋白酶、BLANOSE®羧甲基纤维素钠、无水柠檬酸、EPIKURON®135F卵磷脂油和亚乙基二次氮基四乙酸二钠盐二水合物(“EDTA”)的水性口服悬浮液。例如，适合的制剂示于表1中。

[0024]

表1

材料	数量/单位剂量	百分比 (w/w)
菠萝蛋白酶 q.s	62.5-88.4 mg	53.1-74.7
BLANOSE®羧甲基纤维素钠	25.9-42.4 mg	22-36
无水柠檬酸	4.7-14.96 mg	4-12.7
EPIKURON® 135F 卵磷脂油	3.5-9.3 mg	3-7.9
亚乙基二次氮基四乙酸二钠盐二水合物	0.8-1.9 mg	0.7-1.6
总计	97.4-156.96 mg	100.0

[0025] 此制剂产生自由流动型粉末。可以将它悬浮于2mL的水中以用于口服给予哺乳仔猪，以预防大肠杆菌或其他微生物诱发的腹泻(“泄泻”)。可以在给予至较大的动物或人类时增加使用量。本文现提供关于这些组分中每一个的进一步的细节。

[0026] 菠萝蛋白酶

[0027] 菠萝蛋白酶是从菠萝植物(凤梨(Ananas comosus))获得的解蛋白性粗提取物的统称。已知菠萝蛋白酶的两种形式；获得自新鲜菠萝果实的果实菠萝蛋白酶、以及获得自所述植物的茎部的茎菠萝蛋白酶。菠萝蛋白酶的主要商业来源是茎菠萝蛋白酶，并且术语“菠萝蛋白酶”和“茎菠萝蛋白酶”可互换使用。

[0028] 菠萝蛋白酶制备自收获果实之后的茎部。将茎部去皮、粉碎并压榨以获得包含可溶性菠萝蛋白酶组分的汁液。进一步的加工包括对压榨的汁液进行浓缩、过滤并干燥，以得到最终的白黄色或黄褐色干燥粉末。所得菠萝蛋白酶提取物是蛋白降解酶(称为蛋白水解酶或蛋白酶)和较小量的若干其他物质(例如过氧化物酶、酸性磷酸酶、某些蛋白酶抑制剂、和钙)的混合物。

[0029] 菠萝蛋白酶内的主要蛋白水解酶是称为茎菠萝蛋白酶的蛋白酶CAS 37189-34-7(EC 3.4.22.32)，而果实菠萝蛋白酶提取物内的主要蛋白酶称为果实菠萝蛋白酶(EC 3.4.22.33)。这些蛋白酶由于需要半胱氨酸侧链的游离巯基用于发挥功能而被称作巯基蛋白酶。茎菠萝蛋白酶对于裂解蛋白质具有广泛特异性，并且在小分子底物中对于Z-Arg-Arg-|-NHMec具有强偏好性。果实菠萝蛋白酶对于Bz-Phe-Val-Arg-|-NHMec具有强偏好性。

[0030] 除非另外限定(例如“果实菠萝蛋白酶”)，本文在此使用术语“菠萝蛋白酶”以指代来自菠萝茎部的粗提取物，并且使用“茎菠萝蛋白酶”以描述主要的蛋白酶。

[0031] 菠萝在南美洲和中美洲的土著人中作为药用植物具有悠久的历史。首例菠萝蛋白酶从菠萝果实的分离由委内瑞拉化学家韦森特·马卡诺(Vicente Marcano)于1891年记录。在1892年，拉塞尔·亨利·奇滕登(Russell Henry Chittenden)在埃利奥特·P.·乔斯林(Elliott P.Joslin)和弗兰克·谢尔曼·梅拉(Frank Sherman Meara)的辅助下，完整地研究了所述物质并称其为‘菠萝酶(bromelin)’。后来，引入术语“菠萝蛋白酶”，并且最初将所述术语应用于来自植物家族凤梨科的任何成员的任何蛋白酶。

[0032] 菠萝蛋白酶在民间和现代具有悠久的药用历史，并且在替代医学中继续作为潜在的修复剂被开发。它还作为植物治疗药被广泛地接受。在1957年菠萝蛋白酶首次被引入为治疗补充剂。在夏威夷首次进行了对菠萝蛋白酶的研究，但最近已经在亚洲、欧洲、和拉丁美洲的国家中进行了研究。近来，德国研究者已经在菠萝蛋白酶研究中表现出很大兴趣。当前，菠萝蛋白酶是在德国第十三种最广泛使用的草药。

[0033] 菠萝蛋白酶的一些治疗益处是可逆地抑制血小板聚集、可逆地抑制心绞痛、可逆地抑制支气管炎和窦炎、治疗手术创伤、血栓性静脉炎、以及肾盂肾炎。它还可以在手术或损伤之后使用，以减轻尤其是鼻和窦的肿胀(炎症)。它还用于预防在高强度运动之后的肌肉酸痛。另外已经报道菠萝蛋白酶干扰肿瘤细胞的生长并减慢血液凝固。参见www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/895.html。菠萝蛋白酶还用于枯草热、治疗肠道病症(包括肿胀和溃疡(溃疡性结肠炎))、去除烧伤后的死组织和受损组织(清创术)、预防在肺中的集水(肺水肿)、放松肌肉、刺激肌肉收缩、改进抗生素的吸收、预防癌症、缩短产程、以及帮助身体消除脂肪。在食品制备中，菠萝蛋白酶用作肉类嫩化剂，并用于澄清啤酒。

[0034] 在欧洲已经研究了系统性酶疗法(由蛋白水解酶例如菠萝蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、和木瓜蛋白酶的组合组成)，以用于治疗乳腺癌、结直肠癌和浆细胞瘤患者。在患有实验性结肠炎的小鼠中，来自菠萝茎部或来自新鲜汁液的菠萝蛋白酶的六个月的膳食降低了结肠炎症的严重性并减少了结肠中癌性病灶的数量。

[0035] 菠萝蛋白酶补充剂当与其他药物(阿莫西林、抗生素、抗凝剂/抗血小板药)一起服用时可以增加与心率、血液凝固和术后出血相关联的风险。

[0036] 菠萝蛋白酶的抗转移和抗炎活性显然独立于其蛋白水解活性。虽然知之甚少，但是菠萝蛋白酶的多样的生物学效应似乎依赖于其穿越膜屏障的能力，即这种化合物的非常不寻常的特性。

[0037] 作为潜在的抗炎剂，菠萝蛋白酶可以用于治疗关节炎，但既未在用于此用途的人类研究中被确认，也未被食品药品管理局或欧洲食品安全署批准用于这种效应的健康声明。天然药物综合数据库(Natural Medicines Comprehensive Database)提示菠萝蛋白酶当结合胰蛋白酶(不同的蛋白酶)和芦丁(荞麦中发现的物质)一起使用时在骨关节炎的管理中与一些处方止痛药一样有效。将菠萝蛋白酶与胰蛋白酶和芦丁组合的产品(WOBENZYME™)是可商购的，并且显现在患有骨关节炎的人群中减轻疼痛并且改善膝功能。然而，国立卫生研究院指出“不存在足够的科学证据判定菠萝蛋白酶是否对其任何其他用途有效”。参考同上。菠萝蛋白酶作为在名称ANANASE™下的产品在一些国家也是可获得的。

[0038] 菠萝蛋白酶尚未科学地被证明在任何其他疾病中是有效的，并且它尚未被食品药品管理局许可用于治疗任何其他障碍。

[0039] 菠萝蛋白酶生产于种植菠萝的泰国、台湾和世界的其他热带地区。

[0040] 菠萝蛋白酶已经示出有效的广谱抗腹泻药的前景，因为它靶向于腹泻的根本原因：炎症途径和分泌途径。菠萝蛋白酶具有三重作用机制。参见图2。首先，它预防细菌附着至小肠，由此预防其定殖。其次，它预防并逆转过多流体分泌和腹泻的根本原因即细菌毒素以及炎症介质的作用。这是通过阻断肠毒素和炎症介质诱发的环AMP、环GMP和Ca^{2+}胞内信号传导通路(所述通路诱发肠液分泌和分泌性腹泻)来实现的。第三，菠萝蛋白酶还通过防止ERK-2、JNK和p38丝裂原活化的蛋白(MAP)激酶通路的激活以通过减少促炎性细胞因子(包括TNFα、IFNγ、和IL-6)的产生及作用来抑制炎症。这些通路和促炎性细胞因子在由志贺氏菌属、沙门氏菌属、和艰难梭菌诱发的肠屏障功能障碍中以及在慢性炎症(例如在患有炎症性肠病(IBD)的患者中)中发挥着关键作用。

[0041] 因为菠萝蛋白酶作用于腹泻的根本机制，不像仅靶向特定类型的病原体的抗生素

和疫苗，菠萝蛋白酶针对一系列不同的腹泻原因是有效的。另外，因为菠萝蛋白酶不是抗生素并且不靶向病原体，它不会带来抗生素抗性的日渐增多的问题，这是严重的全球健康问题。

[0042] 本文的制剂的使用预防在断奶时的炎症，改善肠道健康，并且提高饲料摄取量。断奶是仔猪生命中的关键时期。它必须应对与母猪的分离、从高度易消化奶到不太好消化且更复杂的固体饲料的过渡、新的环境、运动和与同窝出生仔畜的分离、以及暴露于陌生的猪中。这些应激源可以导致饲料摄取量降低和仔猪生长减慢。

[0043] 此外，刚断奶的猪的免疫和消化系统仍正在成熟中，使得仔猪更易受抗原攻击(营养或微生物的)的影响，这可以导致炎症反应。炎症诱发对肠道的消化和吸收能力以及整个肠道健康的负面影响，为动物变得更易受病原体影响创造了机会。在病原体暴露时其降低的饲料摄取量不佳的动物将会生病。

[0044] 在仔猪的胃中不存在饲料会导致微生物失衡，引起更高的疾病发生率。因此，在猪生命中的这段短的断奶阶段可以具有深远的影响，不利地影响猪的整个育成期。

[0045] 菠萝蛋白酶的抗炎活性减少肠道炎症，并且保护仔猪免于疾病，并增加仔猪在断奶后期期间的食物摄取量。

[0046] BLANOSE®羧甲基纤维素钠

[0047] 用于工业用途的纤维素主要获得自木浆和棉。使用硫酸盐法(kraft process)从植物物质的另一主要组分木质素分离纤维素。纤维素没有味道，没有气味，是亲水的，具有20-30的接触角，不溶于水和多数有机溶剂，是手性的且是生物可降解的。可以将纤维素通过将其用浓酸在高温下处理而化学降解为其葡萄糖单元。

[0048] 纤维素衍生自D-葡萄糖单元，所述葡萄糖单元通过β(1→4)-糖苷键缩合。这种连键基序与在淀粉、糖原和其他碳水化合物中存在的α(1→4)-糖苷键形成对比。纤维素是直链聚合物：不像淀粉，不存在螺旋或分支，并且所述分子采用延伸且相当硬的杆状构象，辅以葡萄糖残基的平伏(equatorial)构象。在来自一条链的葡萄糖上的多个羟基基团与相同或相邻链上的氧原子形成氢键，将链紧固地并排保持在一起并且形成具有高拉伸强度的微原纤维。这赋予了细胞壁拉伸强度，在细胞壁处纤维素微原纤维编织成多糖基质。

[0049] 与淀粉相比，纤维素还是更加呈晶体状的。淀粉当在水中加热超过60℃-70℃(如在烹调中)时经历晶体到非晶态的转变，然而纤维素需要320℃的温度和25MPa的压力以在水中变为非晶态。

[0050] 纤维素的若干不同晶体结构是已知的，对应于链间和链内的氢键的位置。天然纤维素是具有结构I_α和I_β的纤维素I。由细菌和藻类产生的纤维素富含I_α，而高等植物的纤维素主要由I_β组成。在再生纤维素纤维中的纤维素是纤维素II。纤维素I转化为纤维素II是不可逆的，表明纤维素I是亚稳的而纤维素II是稳定的。在用不同的化学处理的情况下，有可能产生结构纤维素III和纤维素IV。纤维素的许多特性取决于其链长或聚合程度、构成一个聚合物分子的葡萄糖单元的数目。来自木浆的纤维素具有在300和1700个单元之间的典型链长；棉和其他植物纤维以及细菌纤维素具有范围为从800至10000个单元的链长。从纤维素降解得到的具有非常小的链长的分子称为纤维糊精；相比于长链纤维素，纤维糊精典型地可溶于水和有机溶剂。

[0051] 甲基纤维素(methyl cellulose)(或甲基纤维素(methylcellulose))是衍生自纤

维素的化学化合物。它是处于纯形式的亲水性白色粉末，并且溶解于冷(而不是热)水中，形成澄清的粘性溶液或凝胶。它在多种商标名下被销售，并且在各种食品和化妆品中用作增稠剂和乳化剂，并且还作为便秘的治疗剂。像纤维素一样，它是不易消化的，没有毒性，并且不是过敏原。

[0052] 甲基纤维素并非天然存在，而是通过用苛性碱溶液(例如氢氧化钠溶液)加热纤维素并将其用甲基氯处理而合成性地产生。在随后的取代反应中，羟基残基(-OH官能团)被甲氧化物(-OCH_3基团)替代。

[0053] 不同种类的甲基纤维素可以根据取代的羟基基团的数目来制备。纤维素是由众多连接的葡萄糖分子组成的聚合物，这些葡萄糖分子各自暴露三个羟基基团。给定形式的甲基纤维素的取代度(DS)被定义为每个葡萄糖被取代的羟基基团的平均数目。因此DS的理论最大值是3.0，然而更典型的值是1.3-2.6。不同的甲基纤维素制品还可以在其聚合物骨架的平均长度上不同。

[0054] 甲基纤维素具有在40℃和50℃之间的较低的临界溶解温度(LCST)。在低于LCST的温度下，它易溶于水；在高于LCST时，它是不溶的，这具有似非而是的效应即加热甲基纤维素的饱和溶液会使其变为固体，因为甲基纤维素会沉淀析出。发生这种情况的温度取决于DS-值，较高的DS-值给出较低的溶解度和较低的沉淀温度，因为极性羟基基团被掩蔽。用冷水制备甲基纤维素的溶液是困难的：因为粉末与水接触时，凝胶层在其周围形成，显著减慢了水扩散进入粉末中，因此内部仍然是干燥的。

[0055] 羧甲基纤维素(CMC)或纤维素胶是具有羧甲基基团(-CH_2-COOH)的纤维素衍生物，羧甲基基团结合至构成纤维素骨架的吡喃葡萄糖单体的羟基基团中的一些上。它常常作为其钠盐即羧甲基纤维素钠而被使用。

[0056] CMC作为粘度调节剂或增稠剂用于食品科学中，并且在多种产品(包括冰淇淋)中用以稳定乳液。它还是许多非食品例如人体润滑剂、牙膏、缓泻药、减肥药丸、水基涂料、洗涤剂、织物上浆料和多种纸产品的成分。它被首先使用是因为它具有高的粘度，无毒，并且因主要纤维来源是软木浆或是棉短绒通常被认为是低变应原性的。CMC广泛地用于不含谷蛋白且具有减少的脂肪的食品中。CMC还作为增稠剂用于药物中。

[0057] 羧甲基纤维素钠还被称为交联羧甲基纤维素钠，是内部交联的羧甲基纤维素钠。它在药物制剂中被用作超级崩解剂。

[0058] 在表1中的示例性配方使用BLANOSE®牌食品级羧甲基纤维素钠，可从美国肯塔基州卡温顿的亚什兰化学公司(Ashland Chemical Co.)商购。食品级和药物级羧甲基纤维素钠可获得自其他供应商，例如西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich Inc.)和光谱化学公司(Spectrum Chemical,Inc.)。除了或替代羧甲基纤维素钠，可以使用其他胶凝剂。

[0059] 无水柠檬酸

[0060] 柠檬酸是商品化学品，可商购自很多供应商。它主要用作酸化剂、调味品、以及螯合剂。

[0061] 柠檬酸是弱有机酸，化学式为$C_6H_8O_7$。它是天然防腐剂/保存剂，并且还用于为食品和饮品添加酸性味道或酸味。在生物化学中，柠檬酸的共轭碱柠檬酸盐作为发生于所有好氧生物代谢中的柠檬酸循环中的中间体是重要的。它由3个羧基(R-COOH)基团组成。

[0062] 在室温下，柠檬酸是白色晶体粉末。它能以无水(不含水)形式或作为一水合物存

在。无水形式从热水中结晶，而在柠檬酸从冷水中结晶时形成一水合物。一水合物可以通过加热至高于78℃而转化为无水形式。

[0063] 柠檬酸的主导用途是作为食品和饮料(尤其是软饮品)中的调味品和防腐剂。柠檬酸盐的缓冲特性用于控制药物中的pH。本文优选的是，使用的柠檬酸符合由美国药典公布的食品化学法典所限定的柠檬酸作为食品添加剂的纯度要求。

[0064] 在并非旨在受任何理论机制束缚的情况下，本文认为在本文的制剂中的柠檬酸充当乳化剂以防止亲脂性卵磷脂油与亲水性菠萝蛋白酶分离。另外，柠檬酸是结合金属的出色螯合剂。例如，它被用于从锅炉和蒸发器中去除水垢。它可以用于软化水，使其可用于肥皂和洗衣剂中。通过螯合硬水中的金属，它使得这些清洁剂产生泡沫并且发挥更好的作用而无需软化水。螯合活性在本文的制剂中是重要的，因为金属离子可干扰菠萝蛋白酶的生物活性。

[0065] EPIKURON®135F卵磷脂油

[0066] 卵磷脂具有乳化和润滑特性，并且是表面活性剂。如由食品生产商使用的商业卵磷脂是磷脂于油中的混合物。卵磷脂可以通过将提取的种子油进行水脱胶来获得。它是多种磷脂的混合物，并且组成取决于卵磷脂的来源。卵磷脂的主要来源是大豆油。卵磷脂的其他来源(例如向日葵油)可以用于避免大豆过敏问题。在来自大豆和向日葵的卵磷脂中的主要磷脂是磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺、和磷脂酸。它们通常分别缩写为PC、PI、PE、和PA。经纯化的磷脂是由公司商业生产的。

[0067] 为了将卵磷脂的性能修饰为使其适合用于添加它的产品，可以将卵磷脂进行酶水解。在经水解的卵磷脂中，磷脂的一部分的一个脂肪酸被磷脂酶去除。此类磷脂称为溶血磷脂。最常用的磷脂酶是磷脂酶A2，其去除甘油的C2位处的脂肪酸。卵磷脂还可以通过称为分级的工艺来修饰。在此工艺期间，将卵磷脂与醇(通常为乙醇)混合。一些磷脂例如磷脂酰胆碱在乙醇中具有良好的溶解度，而多数其他磷脂在乙醇中不能很好地溶解。将乙醇与卵磷脂泥状物分离，在此之后将乙醇通过蒸发去除以获得富含磷脂酰胆碱的卵磷脂级分。

[0068] 大豆来源的卵磷脂膳食补充剂是由19％-21％磷脂酰胆碱、8％-20％磷脂酰乙醇胺、20％-21％肌醇磷脂、33％-35％大豆油、2％-5％甾醇类、5％碳水化合物/无、1％水分以及5％-11％的其他磷脂构成的。卵磷脂用于在人类食品、动物饲料、药物、涂料、和其他工业应用中应用。在制药工业中，卵磷脂充当润湿稳定剂和胆碱富集载体，有助于乳化和胶囊化，并且是良好的分散剂。卵磷脂被美国食品药品管理局以“总体上被认定为安全的”状态批准用于人类消费。卵磷脂还被欧盟许可作为食品添加剂(指定为E322)。表1的示例性配方使用卵磷脂作为乳化剂。作为乳化剂，卵磷脂赋予了一些优点。在动物饲料中，它丰富脂肪和蛋白质含量，并且改善粒化。调研研究显示大豆来源的卵磷脂对降低大鼠血液中的血清胆固醇和甘油三酯同时增加HDL(“好胆固醇”)水平具有显著作用。它可以被人类完全代谢，所以在摄入时是被人类良好耐受的并且是无毒的。(相比之下，某些其他乳化剂可以仅经由肾脏来排泄)。然而，除了或替代卵磷脂，可以使用其他乳化剂。

[0069] 亚乙基二次氮基四乙酸二钠盐二水合物(“EDTA”)

[0070] 乙二胺四乙酸(广泛地被缩写为EDTA)是螯合剂。它是无色的水溶性固体。其共轭碱是乙二胺四乙酸盐。

[0071] 因其作为螯合剂的作用，即其螯合金属离子例如Ca^{2+}和Fe^{3+}的能力，它的有用性显

现。螯合能力对于本文的制剂而言是有利的，因为金属离子(例如通常存在于在养畜业中使用的自来水中的金属离子)可干扰或抑制菠萝蛋白酶的活性。

[0072] 在被EDTA结合后，金属离子仍然在溶液中但展现出减弱的反应性。EDTA作为一些盐产生，特别是EDTA二钠和EDTA二钠钙。

[0073] 在工业中，EDTA主要用于螯合水性溶液中的金属离子。在纺织工业中，它预防金属离子杂质改变染色产品的颜色。EDTA抑制金属离子尤其是Mn^{2+}催化过氧化氢歧化作用的能力。以类似方式，将EDTA作为防腐剂或稳定剂添加至某些食品中，以预防由金属离子催化的催化性氧化脱色。在包含抗坏血酸和苯甲酸钠的软饮品中，EDTA减少苯(致癌物)的形成。

[0074] EDTA用于在例如用于治疗汞和铅中毒的螯合疗法的实践中结合金属离子。它以类似的方式用于从身体去除过量的铁。这种疗法用于治疗反复输血的并发症，如将其用于治疗地中海贫血。美国FDA在1953年7月16日批准将在Versenate商标名下的EDTA用于铅中毒，所述EDTA授权给了制药公司瑞克(Riker)。一些另类医师认为EDTA充当有力的抗氧化剂以预防自由基损害血管壁，因此减轻动脉粥样硬化。美国FDA尚未将其批准用于治疗动脉粥样硬化。

[0075] 在并非旨在受任何假设作用模式束缚的情况下，EDTA还可以在本文的制剂中充当防腐剂，有可能增强柠檬酸的防腐作用。

[0076] 除了或替代EDTA，技术人员可以使用另外的一种或多种螯合剂。例如，技术人员可以使用结合金属离子但还比EDTA具有较高的生物利用度和较低含量氮的螯合配体。

[0077] 例如，技术人员可以使用亚氨基二琥珀酸(IDS)。自从1998年在商业上使用以来，亚氨基二琥珀酸(IDS)仅在7天后便生物降解约80％。IDS格外良好地结合至钙，并且与其他重金属离子形成稳定的化合物。除了在螯合后比EDTA具有较低的毒性之外，IDS的生产也是环境友好的。此外，IDS是通过使用在可大规模收获的根癌土壤杆菌(BY6)中发现的IDS-差向异构酶和C-N裂解酶来降解的。此外，由两种酶催化的反应不需要任何辅因子并且因此可以直接应用。

[0078] 类似地，技术人员可以使用聚天冬氨酸。聚天冬氨酸(可作为BAYPURE™ DS 100商购)是以环境友好的方式生产的。像亚氨基二琥珀酸一样，聚天冬氨酸结合至钙和其他重金属离子。它具有比EDTA更高的值7.2meq/g，EDTA仅具有6.0meq/g。虽然它具有更高的理论能力，但在实际应用中它在较低离子浓度的溶液中展现出低效率。DS具有许多实际应用，包括腐蚀抑制剂、废水添加剂、和农业聚合物。基于BAYPURE™ DS 100的洗衣剂是在世界上第一种实现EU花生态标(flower ecolable)的洗衣剂。

[0079] 类似地，技术人员可以使用乙二胺-N,N'-二琥珀酸(EDDS)。作为EDTA的结构异构体，乙二胺-N,N'-二琥珀酸可以存在三种异构体：(S,S)、(R,S)/(S,R)和(R,R)，但仅S,S-异构体是易于生物降解的。在20天内EDDS展现出人意料高的83％的生物降解率。生物降解率还随所螯合的不同金属离子而不同。例如，铅和锌与EDDS的络合物具有相对相同的稳定性，但铅络合物相比于锌络合物被更高效地生物降解。自2002年起，在欧洲EDDS已经在商业上以大规模表现突出，估算具有每年约15％的需求增长率。

[0080] 类似地，技术人员可以使用甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)。可从巴斯夫有限公司(BASF GmbH)商购的甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)产生自甘氨酸。MGDA具有>68％的高生物降解率，但不像许多其他螯合剂可以在不用改变的细菌的辅助下降解。此外，不像EDDS或IDS，MGDA可

以耐受较高的温度，同时保持高稳定性以及完整的pH范围。结果是，MGDA的螯合强度强于许多商业螯合剂。

[0081] 类似地，技术人员可以使用L-谷氨酸N,N-二乙酸四钠盐(GLDA)。此类基于氨基聚羧酸盐的螯合剂用于控制水基系统中的金属离子。

[0082] 实例

[0083] 在此针对在三种不同类型环境和三种不同气候中生长的猪在真实商业养殖条件下来测试本文的制剂，评估了猪的两个不同年龄组-乳猪(未断奶)和断乳仔畜。

[0084] • 试验1(西班牙)-本文的制剂降低了仔猪中断奶后泄泻的发生率、严重性和持续时间。本文的制剂还减少了对抗生素的需求并改善了饲料转化率(FCR)。

[0085] • 试验2(法国)-当与饲料中的抗生素相比时，本文的制剂改善了平均日增重，并且改善了食物转化率。

[0086] • 试验3(菲律宾)-与抗生素相比，本文的制剂减少了哺乳仔猪中的仔猪死亡。

[0087] • 试验4(澳大利亚)-与抗生素相比，本文的制剂减少了哺乳仔猪中的仔猪死亡。

[0088] 实例1-西班牙(刚断奶的仔猪)。

[0089] 目的：本研究的目的是比较在断奶时本文的制剂的单一口服剂量(4ml)是否可以减少具有大肠杆菌历史的商业养猪场中的泄泻。

[0090] 研究纲要：本研究是比较仔猪的两个平行组的盲法随机现场试验。本文使用了两个测试组(n＝72头/组)：1.本文的制剂，以及2.无处理。在断奶当天(第0天)，将每窝仔猪随机分配至两个不同的处理组中，称重，并且然后给定唯一标识(ID)号。然后将单一剂量的本文的制剂给予至一组仔猪，然后将所述仔猪运输至断奶圈栏中。另一组仔猪未受到处理，但以相同的方式操作。

[0091] 临床参数：每日针对泄泻和任何其他疾病体征监测仔猪。一旦仔猪显示出泄泻体征，则使用评分系统记录它们的ID号、粪便稠度和总体状况(表2)。

[0092] 表2.对粪便稠度和仔猪总体状况进行评分。

[0093]

粪便稠度	总体状况

[0094]

0：正常	0：正常
1：糊状或部分成形（轻度）	1：中度低迷
2：松散，半液体（中等）	2：严重低迷。
3：很多并呈水状（严重）	

[0095] 将动物划分为健康、不适或濒死是基于总临床分数(表3)。总临床分数是每头猪的粪便稠度分数加总体状况分数的和。此分数给出仔猪健康的总体指示。一些仔猪可能患有泄泻，但仍显现是健康的，而其他仔猪可能具有轻度泄泻但是濒死的。本文的制剂显著地降低了仔猪的临床分数，并且因此相比于未处理的猪而言改善了它们的总体健康。

[0096] 表3.通过其总临床分数划分仔猪。

[0097]

总临床分数	分类
0	健康的
1	健康的
2	不适的
3	濒死的，且需要单独的动物治疗。
4+	濒死的，且需要去除和/或安乐死

[0098] 抗生素处理：记录在研究期间给予的所有抗生素处理(动物ID，日期，产品，剂量和给药途径)。

[0099] 仔猪体重：在第0天(断奶时)、第7天和第14天对仔猪单独地进行称重。计算平均日增重(ADG)。

[0100] 饲料摄取量：还对每个圈栏的饲料摄取量进行评估，以确定饲料转化率(FCR)。FCR等于饲料摄取量除以猪的体重。

[0101] 数据分析：为了评价泄泻的发生率、临床分数或发病率(总体状况+粪便稠度)、治疗率和死亡率，所使用的统计程序是具有泊松和二项误差的线性混合模型。室/性别是随机效应，并且治疗为固定效应。使用用于Windows的GenStat(2007)(第10版，VSN国际有限公司(VSN International Ltd.,)，赫默尔亨普斯特德，英国)进行分析。对于体重和平均日增重，所使用的统计程序是具有正态误差的线性混合模型。1型误差≤0.05。

[0102] 结果：

[0103] 临床参数：

[0104] • 当与未处理的猪相比时，在断奶时给予单一剂量的本文的制剂将泄泻的发生率(从断奶后第0天至第19天)显著地降低了40％(图3)($p<0.05$)。此单一剂量保护仔猪持续19天，指示长的作用持续时间。对此农场而言泄泻的原因是大肠杆菌。

[0105] • 在整个研究期间，与在未处理的组中总腹泻分数253相比，在用本文的制剂处理的仔猪组中总腹泻分数(所有腹泻分数之和)为98。

[0106] • 当与未处理的仔猪相比时，本文的制剂显著地改善了仔猪的总体健康，或者它们具有降低的临床分数，因此具有不太严重的疾病(图4)($p<0.05$)。

[0107] • 当与未处理的猪($n=38$)相比时，本文的制剂将病猪数目($n=16$)显著地减少了58％($p<0.05$)。

[0108] • 对比对照(33例处理)，本文的制剂将抗生素处理的数目需求(15例处理)降低了55％。

[0109] • 在用本文的制剂处理的组(4)和在未处理的组(3)中存在相等数量的死亡(所有原因)。

[0110] 猪的性能：

[0111] 在断奶后两周内，用本文的制剂处理的仔猪的平均日增重比未处理的仔猪高22％(分别为50±7.1g对比39±7.0g)。在断奶后第42天，本文的制剂处理的仔猪比对照仔猪重0.2kg(1.6％)，但这个增加不是显著的。

[0112] • 在断奶后的前2周内，用本文的制剂处理的仔猪相比于未处理的猪具有低8.4％的显著更佳的饲料转化率(分别为2.84±1.22对比3.1±1.20)。总体而言(第0天至第42天)，本文的制剂在饲料转化率方面具有2.7％的改善(1.46±0.06对比1.50±0.06)。

[0113] 虽然相比于未处理组而言本文的制剂的总体改善的FCR是适度的(0.04或2.7%)，应指出的是在FCR上的每0.01的改善会将每头猪的饲料成本减少$0.28至$0.30(基于2008年的数据-饲料成本已经显著上升，所以当前的利益将会更大)。还已经计算出生长者FCR的0.1%的改善可以将200头母猪单元的盈利率改进大约$6000/年。FCR的5%的改善对澳大利亚猪肉行业具有$2800万的潜在价值(http://www.australianpork.com.au)。

[0114] FCR的改善的性能是重要的，因为饲料成本是猪肉生产的主要成本，通常占据全部生产费用的超过60%至80%。FCR的每一个改善将降低饲料成本并改善盈利率。

[0115] 结论：

[0116] 在断奶时给予的单一剂量的本文的制剂降低了泄泻的发生率、持续时间和严重性。本文的制剂还降低了对抗生素治疗的需求，并改善了仔猪的生长。因此，本文的制剂改善仔猪健康和性能，并因此改善农场生产力。

[0117] 实例2-法国(断奶的仔猪)。

[0118] 背景：现在在欧洲禁止抗生素作为促进生长的饲料添加剂，然而，允许在兽医监督下将指定的抗生素添加至饲料，以用于预防并治疗急性病症例如泄泻。

[0119] 目的：本研究的目的是将给予了单一剂量的本文的制剂的仔猪的饲料转化率与给予了抗生素粘菌素的仔猪的饲料转化率进行比较。

[0120] 研究纲要：本研究是比较仔猪的三个平行组的盲法对照随机现场试验(n＝89头/组)：1.粘菌素；2.本文的制剂；以及3.无处理。在本研究中，将多个整窝随机化为接受不同的处理，因此基于整窝来处理多个窝。

[0121] 此农场的断奶以2个阶段发生。在阶段1中，通过移除母猪来使仔猪断奶(在第-5天)。然后在第0天，将仔猪移至它们的断奶圈栏。

[0122] 在第-5天，向第1组仔猪在幼畜早期饲料(pre-starter feed)中给予粘菌素(9kg抗生素预混物/吨饲料)持续14天(第-5天至第9天)。另外两个组仅给予幼畜早期饲料。在第0天(断奶5天后)，当将仔猪移至它们的断奶幼畜圈栏时，第2组仔猪接受单一剂量的本文的制剂。第3组仔猪未受处理。

[0123] 分析：依据研究1。

[0124] 结果：

[0125] 猪的性能

[0126] • 与接受粘菌素的仔猪相比，本文的制剂处理的仔猪在研究的所有阶段期间具有显著更高的平均日增重(P<0.05，表4)。在所有组中，在其饲料中用粘菌素处理的仔猪具有最低的增重，包括比未处理的猪更低的增重(P<0.05)。

[0127] 表4-所有组的平均日增重(g)。

[0128]

	本文的制剂	粘菌素	未处理的
幼畜早期（第-5天至第9天）	252±74	167±67	236±63
幼畜	537±105	505±110	542±110
断奶后	429±81	377±82	426±75
断奶并养肥后（总体）	692±65	664±67	678±56

[0129] • 总体上(在150日龄时)，给予了本文的制剂的仔猪的平均总增重比对照猪高2%

(或1.71kg)，并且比在饲料中给予了粘菌素的仔猪高3.9％(或3.25kg)(P<0.05)。

[0130] • 仅针对幼畜早期阶段(第-5天至第9天)确定了饲料摄取量。在整个断奶期，本文的制剂处理的仔猪具有比在饲料中接受粘菌素的仔猪更高的饲料摄取量(表5)。

[0131] 表5.在幼畜早期阶段期间的饲料摄取量(g)

[0132]

	本文的制剂	粘菌素	对照
圈栏数	6	6	6
最小值-最大值	408-499	358-479	420-529
算术平均值	450	417	460

[0133] • 仅针对幼畜早期阶段(第-5天至第9天)确定了饲料转化率(FCR)。相比于所有其他组，单独用本文的制剂处理的仔猪具有最佳FCR(1.82)(P<0.009)(表5)。与用粘菌素处理的仔猪(2.71)相比，用本文的制剂处理的仔猪具有33％的改善。尽管用本文的制剂处理的仔猪具有比未处理的猪更低的饲料摄取量(表5)，与未处理的猪(1.96)相比，它们的FCR仍具有7％的改善(表6)。这些性能结果显示本文的制剂具有优于饲料中的粘菌素的显著优势。

[0134] 表6.在幼畜早期阶段期间每个组的饲料转化率

[0135]

	本文的制剂	粘菌素	对照
圈栏数	6	6	6
中值	1.77	2.59	2.01
最小值-最大值	1.59-2.10	1.75-3.42	1.63-2.11
算术平均值	1.82	2.71	1.96

[0136] 粘菌素对FCR的负面作用可能是因为其对肠道菌群的不利影响以及因此对猪肠道健康和营养的负面作用。

[0137] 结论：本文的制剂改善了仔猪的增重并改善了食物转化率。

[0138] 实例3-菲律宾(未断奶的仔猪或哺乳仔猪)。

[0139] 背景：在菲律宾的此农场因泄泻具有高的死亡率。

[0140] 目的：本研究的目的是将本文的制剂与抗生素在未断奶的仔猪中的功效进行比较。

[0141] 研究纲要：本研究是比较仔猪的两个组的随机现场试验。由于此农场的死亡率非常高，不存在阴性对照(未用药组)。测试组(n＝38头/组)是1.本文的制剂(2剂)，以及2.抗生素(每3天口服给予)。仔猪在3日龄时接受本文的制剂。在6日龄时给予后续剂量。

[0142] 结果：

[0143] 临床参数

[0144] • 在本研究中存在少量因泄泻造成的死亡。但在用本文的制剂处理的组中存在5％的显著更低的死亡(来自所有原因)。在接受抗生素的仔猪中死亡率是21％(P<0.05)。

[0145] 性能参数

[0146] • 在断奶时，接受本文的制剂的仔猪体重比用抗生素处理的仔猪重0.1kg。由于在本研究中不存在阴性对照，未知的是本文的制剂是否如在其他现场试验中观察到的具有优

于未处理的猪的增加的体重。

[0147] 实例4-澳大利亚(未断奶的仔猪或哺乳仔猪)。

[0148] 目的:本研究的目的是探究本文的制剂(2mL)在降低具有断奶前(乳猪)泄泻历史的澳大利亚农场中的仔猪死亡率和发病率中的功效。

[0149] 研究纲要:所述研究是在位于澳大利亚北维多利亚的商业养猪场中进行的。此农场具有通常在出生后第3-4天发生的断奶前泄泻的问题历史。在所述研究前一个月从农场获得的粪便样品指示泄泻是由于大肠杆菌(K99,STa毒素基因)和轮状病毒的组合感染。当前方法例如疫苗以及抗生素已经不能足以控制所述问题。

[0150] 本研究是比较仔猪的两个平行组的盲法、安慰剂对照的随机现场试验。农场主和农场工作人员对处理不知情。

[0151] 有21窝(233头仔猪)在2日龄时给予本文的制剂(2mL)(第1组),同时有23窝(229头仔猪)接受安慰剂(第2组)。

[0152] 每个组包含相等的小母猪窝数(或初产母猪)。

[0153] 允许继续农场的一般管理日常程序,包括通常的药物治疗例如母猪疫苗接种、抗生素、和抗球虫药,以及仔猪的交叉哺育,在这种情况下可以将小的仔猪或不健康的那些移至另一母猪。

[0154] 由独立的兽医和来自维多利亚经济发展、就业、运输及资源部门的养猪专家中心的研究者进行试验。确定了适当的统计分析并且由独立的生物统计学家应用。

[0155] 试验研究了死亡和泄泻的发生率、发病率(或仔猪临床病症)、以及增重、和从2日龄到21日龄的平均日增重(ADG)。每日针对泄泻和任何其他疾病体征监测仔猪。一旦仔猪显示出泄泻体征,则使用表2中所述的评分系统记录它们的ID号、粪便稠度和总体状况。

[0156] 基于人道主义对发现严重低迷的任何仔猪实施安乐死。对在试验期间实施安乐死的或发现死亡的仔猪在死亡的12小时内进行验尸。

[0157] 数据分析:

[0158] 在棚中存在随机放置的两种处理的21-23个重复。

[0159] 在圈栏中的一窝仔猪是实验单元。

[0160] 确定了适当的统计分析并且由独立的生物统计学家应用。

[0161] 在经$\log_e$+0.05转化以稳定方差之后以单因素方差分析(ANOVA)来分析每个圈栏的平均最大泄泻分数和发病率分数。所有仔猪的ADG都不适用于ANOVA,因为在拟合值的整个范围上残差既未呈正态分布又不是齐性的;所以我们使用了非参数(自由分布)克鲁斯卡尔-沃利斯(Kruskal-Wallis)检验。

[0162] 使用适用于小单元尺寸的精确二元回归来分析泄泻的死亡率和发生率以及发病率。使用双尾显著性检验。

[0163] 使用统计计算R基础R版2.7.2(2008)进行ANOVA和克鲁斯卡尔-沃利斯检验。用StatExact(Cytel统计软件,Cytel软件公司,马萨诸塞州,美国)进行精确二元回归。

[0164] 结果:

[0165] 临床参数

[0166] 所述研究被设计为预防性研究,其中将本文的制剂在预期泄泻发作之前给予仔猪。然而,在产品给予之前,在462头仔猪中有59头(12.8%)泄泻是明显的。尽管比预期泄泻

发作要早，将所有仔猪包含在所述研究中，并且不存在排除。

[0167] 表7示出了在两组中由于所有原因造成的断奶前死亡数目。本文的制剂将仔猪死亡率显著降低了47.8%($p<0.02$)。相比于在对照组中229头仔猪有36头(15.7%)死亡，在用本文的制剂处理的仔猪中，233头仔猪中有19头(8.2%)死亡。

[0168] 表7-断奶前死亡率(所有原因)

[0169]

处理	每组的猪数目	猪数目	死亡率%
本文的制剂	233	19	8.2%
未处理的	229	36	15.7%
降低%			47.8%

[0170] 基于验尸后的发现，在本研究中仔猪死亡的主要原因(81.8%)被诊断为泄泻和体弱。

[0171] 病因学

[0172] 从24头小于7日龄的仔猪收集样品。在本研究中未鉴别到占主导的病原体。将二十三个粪便样品进行培养(好氧和厌氧)以分离腹泻的可能的细菌原因(大肠杆菌和梭菌属)。用本文的制剂处理的一头仔猪测试为非溶血性大肠杆菌阳性(STa阳性)，并且两个溶血性大肠杆菌分离株(K88)获得自来自对照组的两头仔猪。这些对照仔猪之一具有与非溶血性大肠杆菌(K88)的共感染。未分离到梭菌属。21个粪便样品中有九个(42.8%)通过轮状病毒ELISA(IDEXX Rota-Corona-K99，IDEXX蒙彼利埃SAS，法国)测试为阳性或弱阳性。然而，在7个样品中没有一个在轮状病毒RTPCR上呈阳性，也没有指示轮状病毒感染的肠道病变。

[0173] 经验尸的高比例26/53(49%)的仔猪具有空胃，表明在此农场中存在的腹泻/体弱可归因于仔猪不充足的初乳和乳摄取，引起仔猪次佳的营养摄取和不良的乳源性保护。

[0174] 发病率

[0175] 本文的制剂还降低了严重的发病率或减少了威胁生命的疾病(分数4)。在具有威胁生命的疾病或被认为濒死的仔猪中，38头对照仔猪中有36头死亡，相比而言在用本文的制剂处理的组中濒死的28头仔猪中有19头死亡。

[0176] 性能参数

[0177] 表8示出了两个组的增重的均值和范围(从处理当天，第2天至第21天)以及平均日增重(ADG)。

[0178] 表8-从第2天至断奶第21天的增重和ADG。

[0179]

处理	圈栏数	一窝仔数(断奶的)	平均增重(g)(最小值-最大值)	平均ADG(g/天)(最小值-最大值)
本文的制剂	21	10.19	4188(2512至5279)	199(120至251)
对照	23	8.48	3964(939至5205)	189(45至248)
增加%			5.7%	5.6%

[0180] 本文的制剂将增重和平均日增重增加了5.7%(或224g/头仔猪)和5.6%。但这些增重在窝水平上并非是统计学上显著的($p=0.49$)(但在单独仔猪水平上是显著的，$p<0.04$)。

[0181] 讨论与结论：

[0182] 本研究的结果表明本文的制剂可以用于在具有腹泻/非特异性病因的体弱的问题的农场中降低断奶前死亡率。

[0183] 体弱和发育停滞是仔猪在生命的第一周死亡的主要原因。在出生后的最初24小时内不能摄入初乳的仔猪处于早期死亡的风险，这是由于能量摄取不足而遭母猪挤压或遗弃的结果。不像人类婴儿，没有抗体经由来自母猪的胎盘而被转移给仔猪。所以在没有母体抗体的情况下，仔猪非常易于受感染的影响。如果它们在最初几天存活，但继续具有不足的乳摄取，则仔猪相比于它们更稳健的同窝出生仔畜更有可能因低的乳源性免疫力(来自母猪乳中的乳抗体和免疫因子)而死于感染性疾病。由于母猪不佳的产乳量或仔猪的低消耗，不能维持足够的乳摄取的那些仔猪再次更有可能由于不能与同窝出生仔畜竞争而经受早期死亡或在生命后期死于感染性疾病。

[0184] 在本研究中，本文的制剂将商业农场的哺乳仔猪中的断奶前死亡率减半。这样看来其作用模式是通过改善活力并因此改善濒死仔猪在生命的第一周的存活率。这是通过较低比例(45.2％)的用本文的制剂处理的并被划分为临床濒死的死亡或不得不实施安乐死的仔猪来证实的，相比而言在相同的临床分类中在对照组中为76.6％。

[0185] 用本文的制剂处理的仔猪比在对照组中的仔猪生长地快5.7％。虽然这个增重差异不是显著的，这相当于在断奶时活重的大约225g的差异。断奶体重与仔猪的后续生长和存活是正相关的。

[0186] 综述

[0187] 在给出在此的披露的情况下，技术人员可以容易地做出某些变型和替代方案。例如，表1的制剂提供了适用于哺乳仔猪的预防性治疗以预防泄泻的剂量。治疗(而非预防)泄泻的用途可需要不同剂量；技术人员应能够容易地推导出适当的剂量。类似地，治疗成熟的成猪或人类的用途可需要更大的剂量；技术人员应能够容易地推导出适当的剂量。

[0188] 技术人员可以将本文的制剂提供为口服灌药，例如需要用水重构的粒化粉末。为了预防断奶后泄泻，可以将本文的制剂在断奶当天(在预期泄泻发作前1-2天)作为仅一次口服剂量4ml(0.24g)来给予。为了预防断奶前泄泻，可以根据具体的农场问题时期在2-5日龄给予2ml(0.12g)单一口服剂量。可在3-7天后需要重复剂量。作为治疗剂，可以在疾病症状出现时立即给予本文的制剂(2ml或4ml)。

[0189] 技术人员可以将本文的制剂提供为饲料添加剂，例如制备为可以添加至猪饲料中的粒化粉末。为了确保产品的彻底分散，应在掺入最终混合物之前先将其与适当量的饲料成分进行混合。本文的制剂可以仅作为预混物或掺入最终混合物中的预混物来饲喂。推荐剂量水平是连续14天每日饲喂40mg本文的制剂/kg体重。

[0190] 技术人员还可以将本文的制剂于水中经由饮用系统递送。可替代地，技术人员可以使用菠萝蛋白酶来制备等效口服灌药，将所述口服灌药用赋形剂进行配制并且需要在液体中重构。为了预防断奶后泄泻，可以将其在断奶当天(在预期泄泻发作前1-2天)作为仅一次口服剂量(125mg)来给予。为了预防断奶前泄泻，可以根据具体的农场问题时期在2-5日龄给予62.5mg单一口服剂量。可在3-7天后需要重复剂量。作为治疗剂，可以在疾病症状出现时将其立即给予(62.5mg或125mg)。

[0191] 可替代地，技术人员可以使用菠萝蛋白酶来制备等效饲料添加剂，例如作为可以添加至猪饲料中的粉末。为了确保产品的彻底分散，应在掺入最终混合物之前先将其与适

当量的饲料成分进行混合。可以将其仅作为预混物或掺入最终混合物中的预混物来饲喂。推荐剂量水平是连续14天每日饲喂20mg菠萝蛋白酶/kg体重。

[0192] 可替代地，可以将本文的制剂提供为片剂和胶囊剂、以及其他用于人类的适当剂型。

[0193] 技术人员可以针对不同的适应症调整本文的制剂。例如，可以将其用于预防并治疗生产动物(牛、猪等)中的泄泻和人类中的腹泻。还可以将其用于通过减少炎症来改善肠道健康。可替代地，可以将其配制为促进生产动物增加的饲料摄取量，由此促进增重和饲料转化效率。可以将其用于减少对动物饲料中的抗生素需求，以及用于人类的急性给药。还可以将其用于减轻人类中的炎症性肠病。

[0194] 因此，本专利的法律覆盖范围旨在并非由在此引用的具体实例来限定，而是由法律上的权利要求书和其允许的等效内容来限定。

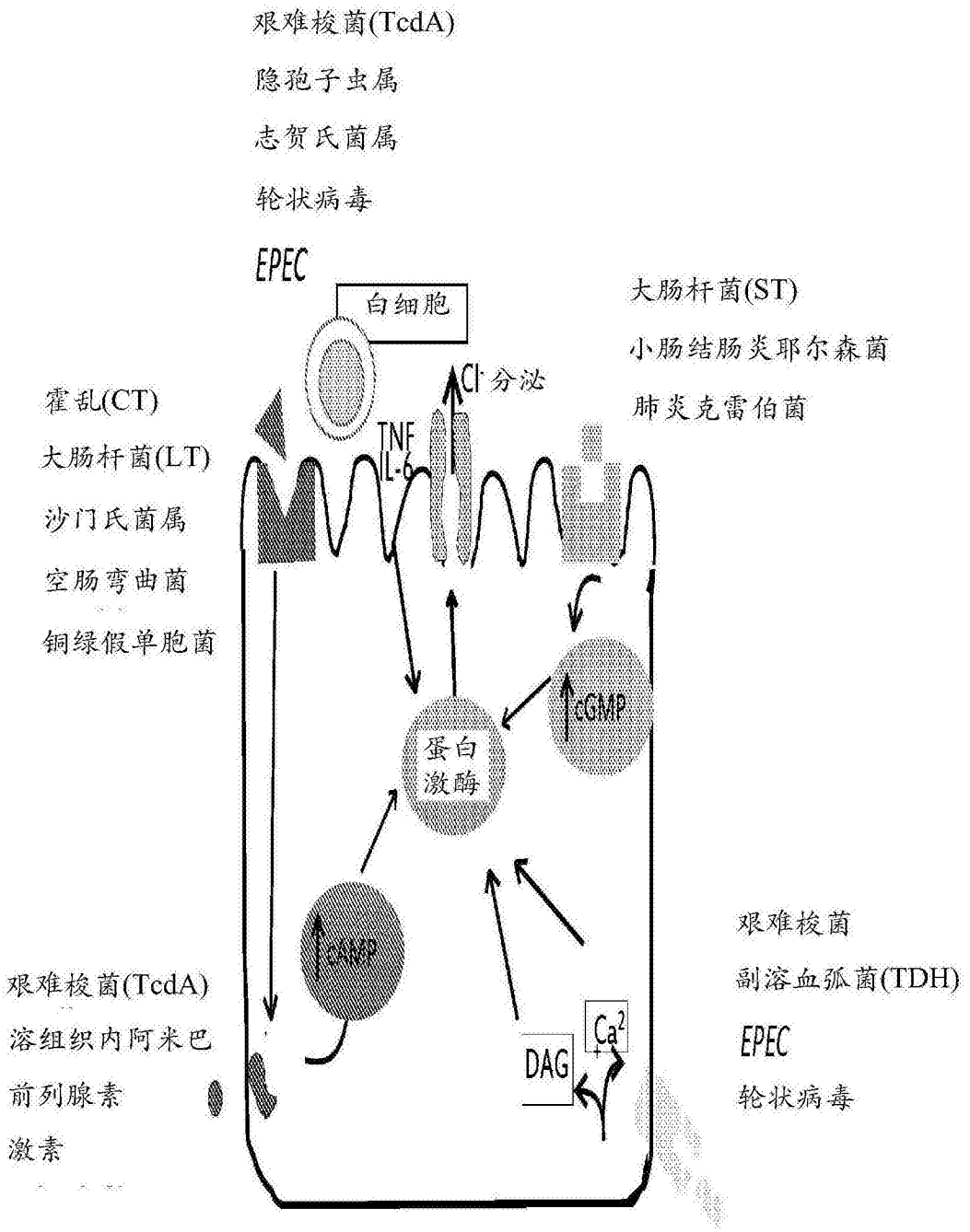


图1-有许多不同的原因导致腹泻,这些原因通过激活一个或多个分泌途径发挥作用。维斯瓦纳坦(Viswanathan)等人,自然微生物学评论(Nature Review Microbiol),2009;霍奇斯(Hodges)和吉尔(Gill),肠道微生物(Gut Microbes),2010。

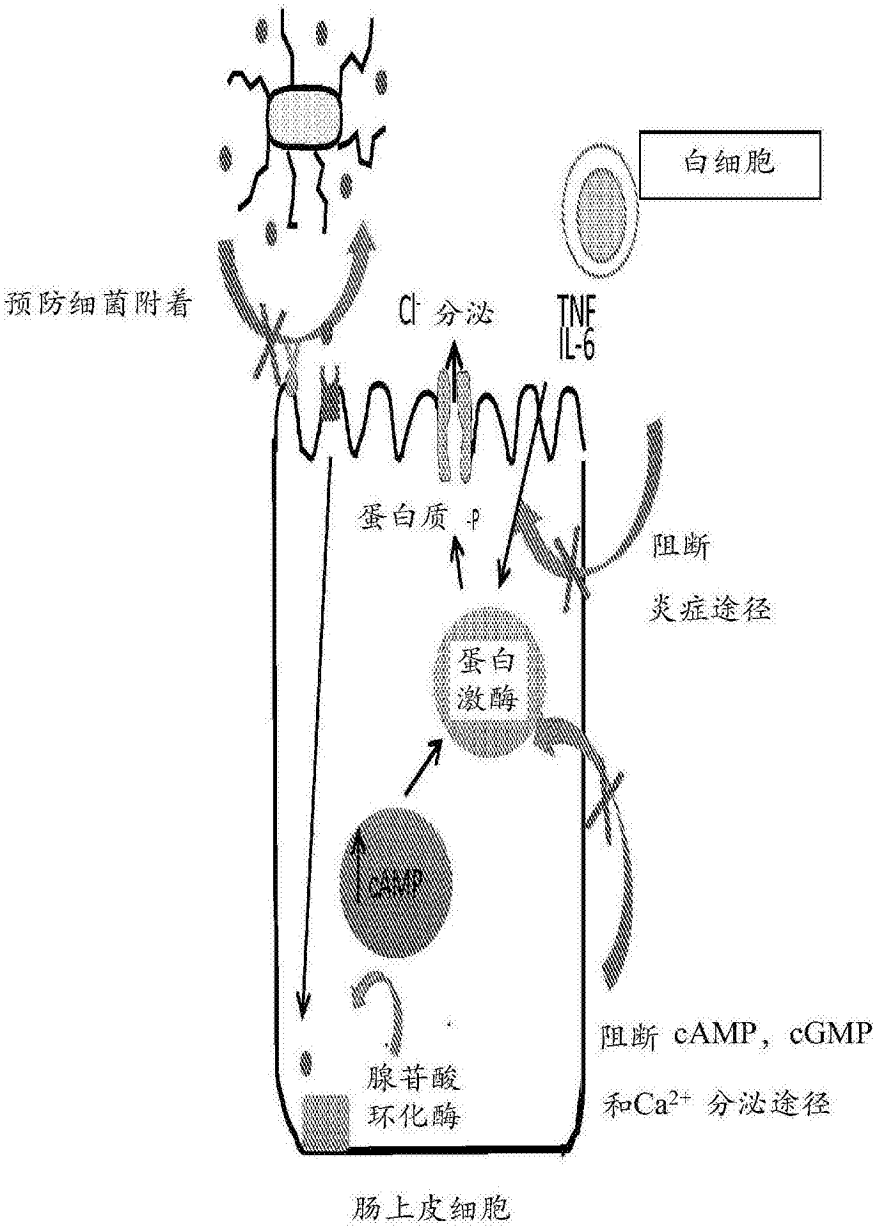


图2-本文的制剂的作用机制。三重作用机制-提供了针对细菌、寄生虫、病毒和炎症的广谱保护。

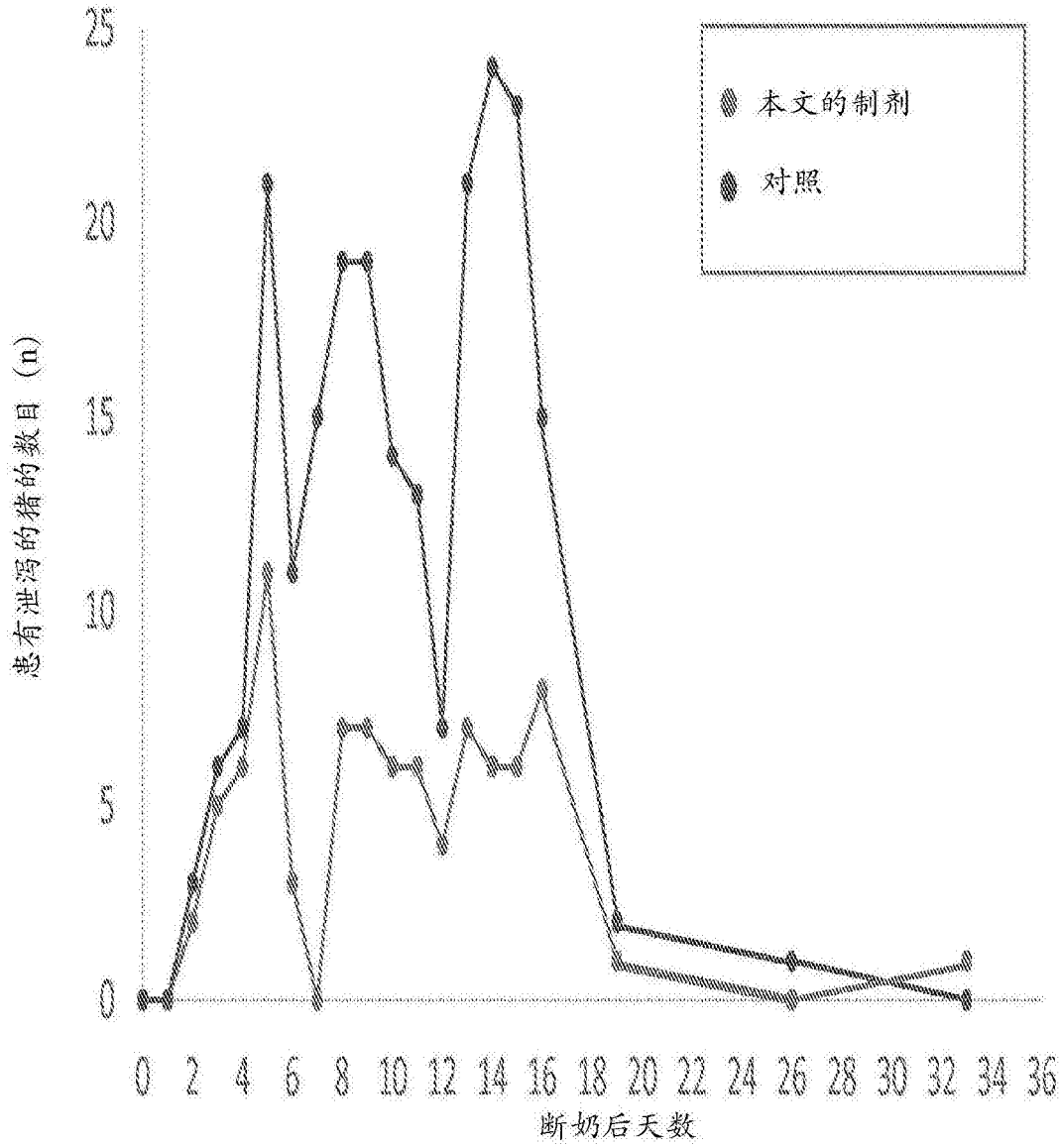


图3-一组仔猪在断奶时(第0天)给予单一口服剂量(4mL)的本文的制剂,或未经处理(对照)。本文的制剂显著地降低泄泻(腹泻)的发生率(P＜0.05)。

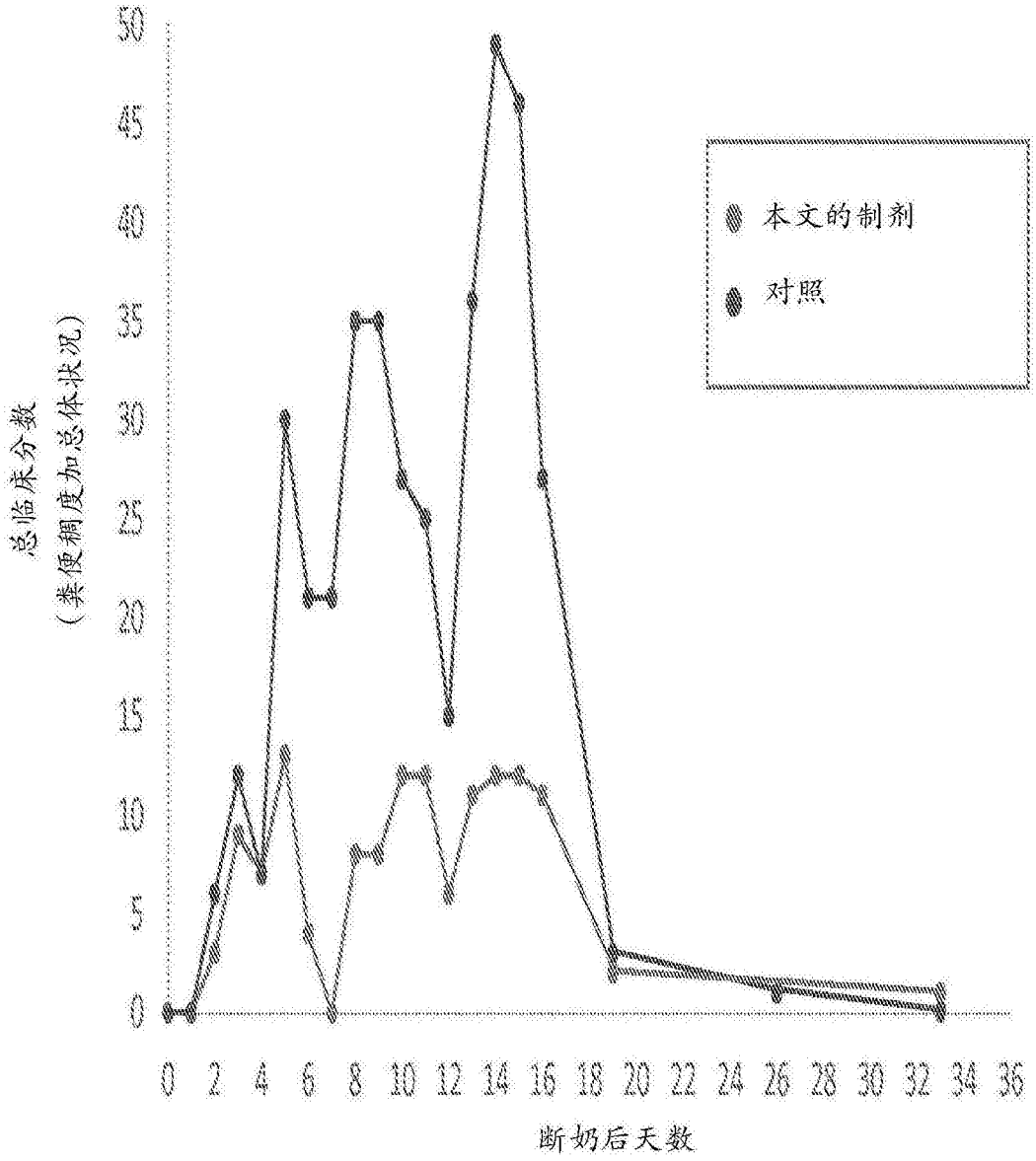


图4-一组仔猪在断奶时(第0天)给予单一口服剂量的本文的制剂。第二组仔猪未经处理(对照)。本文的制剂显著地降低临床分数，并因此改善仔猪的健康($P<0.01$)。

1.口服兽用制剂,包含抗腹泻有效量的菠萝蛋白酶,基本上不含肠溶聚合物。

2.口服兽用制剂,包含抗腹泻有效量的菠萝蛋白酶,基本上不含邻苯二甲酸酯。

3.如权利要求2所述的口服兽用制剂,其中所述邻苯二甲酸酯包括邻苯二甲酸乙酸纤维素。

4.口服兽用制剂,包含抗腹泻有效量的菠萝蛋白酶以及螯合剂。

5.如权利要求4所述的口服兽用制剂,其中所述螯合剂包括EDTA。

6.口服兽用制剂,包含抗腹泻有效量的菠萝蛋白酶以及有效于改进所述菠萝蛋白酶在水中的溶解度的量的乳化剂。

7.如权利要求6所述的口服兽用制剂,所述乳化剂包括卵磷脂。

8.如权利要求7所述的口服兽用制剂,进一步包含柠檬酸。

9.抗腹泻口服剂型,包含抗腹泻有效量的羧甲基纤维素。

10.如权利要求9所述的剂型,进一步包含菠萝蛋白酶。

11.如权利要求10所述的剂型,其中所述口服剂型是饮品或口服灌药。

12.如权利要求10所述的剂型,其中所述剂型是兽用剂型。

13.用于在人类、动物或鱼中预防抗微生物剂抗性的病原肠道微生物的增殖的方法,所述方法包括:(a)鉴定易受病原肠道微生物的感染的人、动物或鱼,并且然后(b)向所述人、动物或鱼口服给予有效于预防所述人、动物或鱼由于所述病原肠道微生物而发生腹泻的量的菠萝蛋白酶,借此所述人、动物或鱼不再易受所述病原肠道微生物的感染,借此不给予所述人、动物或鱼抗微生物有效量的抗微生物剂以治疗或预防由所述病原肠道细菌造成的腹泻。

14.用于在人类、动物或鱼中预防病原肠道微生物的增殖的方法,所述方法包括:(a)鉴定易受病原肠道微生物的感染的人、动物或鱼,并且然后(b)向所述人、动物或鱼口服给予有效于预防所述人、动物或鱼由于所述病原肠道微生物而发生疾病的量的菠萝蛋白酶,借此所述人、动物或鱼不再易受所述病原肠道微生物的感染,借此不给予所述人、动物或鱼抗微生物有效量的抗微生物剂以治疗或预防由所述病原肠道微生物造成的所述感染。

15.如权利要求2所述的剂型,其中所述剂型是动物饲料。

16.如权利要求2所述的口服兽用制剂用于促进生长的用途。