

中华人民共和国国家知识产权局

发 明

本栏由国家知识产权局专利局填写

(国家申请号)

申请日

进入国家阶段日期

PCT国际申请进入中国国家知识产权局的国家阶段

代理机构案卷号PN 051031

国际申请号 PCT/HU02/00152

国际申请日 2002年12月19日 (19.12.2002)

优先权日(最早的) 2002年10月31日 (31.10.2002)

国际公布号 WO 2004/039172

国际公布日 2004年05月13日 (13.05.2004)

国际公布语言 英文

发明名称 口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统、其制备方法及其用途

1. 请求授予的保护类型

发明专利

实用新型

2. 对中国的申请人

(1) 姓名或名称: 安娜玛丽亚 瑟凯
地 址: 匈牙利布达佩斯

(2) 姓名或名称:
地 址:

3. 对中国的发明人(姓名)

(1) 安娜玛丽亚 瑟凯	(2)
(3)	(4)
(5)	(6)
(7)	(8)

4. 代理人

代理机构名称: 北京市中咨律师事务所

代理人姓名: 黄革生, 隋晓平

代理机构地址: 北京市西城区阜成门北大街6号-9国际投资大厦C座17层

电 话: 66091188

5. 请求提前处理和审查*

如果自优先权日起30个月的期限尚未届满, 申请人请求国家知识产权局按照中国专利法实施细则第108条提前处理和审查本国际申请。

除上述声明, 同时还附经确认的国际申请文件副本

6. 优先权项

优先权日	在先申请国	在先申请号
(1) 2002年10月31日	匈牙利	P 0203718
(2)		
(3)		
(4)		
(5)		

数据采集栏(由专利局填写)

说明书页数:
附图页数:
核苷酸和氨基酸:
序列表页数:
权项数:
实审请求标记:
涉及生物材料申请

说明书摘要

本发明公开了一种口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统,该系统包含至少一种生物活性物质,该物质至少显著程度、优选均一地吸附在多孔载体的整体中,该载体优选为饲料;所述药物或饲料添加剂传递系统可通过饲料与生物活5 性物质的溶液相混合进行吸附、接着蒸发溶剂来获得。这种添加了药物的饲料容易被动物摄取。本发明还公开了制备该口服兽药或饲料添加剂的方法和其作为药物或饲料添加剂的用途。所述制备方法是在职业安全与环境安全的封闭体系中来进行的。本发明的产物可用于饲养动物和宠物,优选用于饲养淡水和海水鱼类。

说 明 书

口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统、其制备方法及应用

5 技术领域

本发明涉及一种口服兽药传递系统(delivery system)和/或饲料添加剂传递系统,该系统包含至少一种生物活性物质,优选该物质均一地吸附在多孔载体中,本发明还涉及该传递系统的制备方法和所述产物给饲养动物和宠物动物、尤其是鱼类中的用途。

10

背景技术

通过饲料给动物口服生物活性物质是一个涉及传递系统的类型的多变化的领域,即活性物质性质和饲料性质。另一个变量是活性物质在饲料中的分布状态,是分布于整个饲料中,还是仅分布在其表面上。可以通过在饲料制备期间将活性物质添加到饲料中,或者使活性物质与已制备的饲料产物相结合,来制备添加药物的饲料。添加药物的饲料可以在农场、饲料制造厂来制备,或者由药物和预混料生产商来制备。

15

混合饲料成分和药物的方法已有报道。中国专利 1999-115312 描述了含有咪唑酮和土霉素的鱼饲料的生产方法;将药物与微量元素、蛆蛋白、其他植物来源的组分混合,然后制成球粒。

20

中国专利 1999-111364 描述了一种抗寄生虫预混料的制备方法及其在鱼饲料中的应用。将阿维菌素溶于乙醇中,与米糠进行混合,以热空气干燥。然后将该载体-药物的产物与饲料组分混合,所述饲料组分是鱼粉、酱糟、磷酸氢钙、维生素和矿物质。

25

在形成球粒或颗粒之前,在饲料制备过程中向饲料混合组分中直接添加药物和饲料添加剂(此后称为药剂)时,药剂均一地分布于所生产的球粒、颗粒等之中。将活性物质吸附在作为载体的一种饲料组分中,再将该组分与其他组分混合,能够提高传递系统的稳定性。关于在饲料制备中所使用的设备,生产线中的所有设备都被药剂污染。精细设备如挤压机、喷雾干燥机的清洗是耗费时间且昂贵的。

而且, 由于一些未知因素, 如疾病的爆发、被感染动物的种类、它们的数量、是预防还是治疗需求、体重、生长阶段、孵化率、一胎产崽量、存活率等, 不得不在精确需求未知的条件下在饲料中添加药物或将药剂添加到饲料中。

向饲料球粒、颗粒等之中加入药剂的实例已有广泛描述。

- 5 在农场中添加药物的鱼饲料的推荐制备方法是用另外的密封方法对表面包覆。该工序在水泥搅拌机或同等设备中完成: 将未添加药物的鱼饲料、计算数量的药物和可食用鱼油或植物油一起混合数分钟, 来确保均匀包覆。Syndel 国际公司(the Syndel International Inc.)水生生物主页(www.syndel.com)提供了一个制备含氟苯尼考(Aquaflor)(氟苯尼考)的饲料的实例。为了将 Tribissen(甲氧苄氨嘧啶和磺胺嘧啶)粘附在饲料球粒上, 首先在混合机中将油添加到球粒中, 然后将粉末撒入混合机中。在另一个实例中, 先将 Romet-30(磺胺地索辛和奥美普林的组合)悬浮于可食用的植物油中, 再将该浆液用于包覆鱼饲料球粒。

日本专利 2002-58435 中提供了制备添加药物的鱼类饲料的相似的方法。先将二十二碳六烯酸和/或它的乙基酯与鱼油或植物油混合, 然后添加到基础饲料中。

- 15 饲料和药物的混合得到的仅是药物的不牢固的结合; 用油密封不能保证药能渗透到饲料中。因而, 渗出就不能避免。集中于饲料表面的药物损害了饲料的味道, 从而减少了食欲减退的患病动物对药物摄入的可能性。

- 有鳞鱼类的饲料药物实验通常是通过将活性成分溶液喷雾到饲料上来完成的。涉及海产鱼类在淡水中生长的已公开专利申请 WO 02/30215 A2 描述了一种制备食物的方法, 该食物包含 7 w/w% 氯化钠和色氨酸。先制备计算数量的氯化钠和色氨酸的溶液, 灌入手持喷雾器中, 然后喷洒到在水泥搅拌机中旋转的标准淡水鲑科鱼(salmonid)日粮中。在氯化钠-色氨酸溶液被吸收后, 日粮置入加热架系统中的窗口筛上干燥。干燥后, 将球粒送回水泥搅拌机进行表层包覆, 该包覆物由 50% 磷虾(krill)水解产物和 50% 步鱼油组成。喷雾方法通常不能安全地使用; 20 开放的系统具有职业的和环境的危害。喷雾不能使药物溶液渗透入饲料中; 药物仅吸收在表面层中。需要一个额外的步骤来密封, 这涉及到使用附加的设备并造成设备的污染。

美国专利 US 6,387, 393 报道了一种用于制备添加药物的动物饲料的清洁技术, 包括以一种含有药物的粘结性凝胶来包覆饲料。该粘结性凝胶的制备是通过

将药物与胶凝剂(如纤维素聚合物)和其它组分在混合机中混合,并将干燥的混合物保持在小袋中。在使用时,将所述混合物添加到足量的水中以形成悬浮液,用于包覆球粒。将球粒称重后置入适当的混合机(如带状搅拌机)中,然后加入需要量的药物悬浮液。将所述混合物混合5分钟后,分装到纸袋中。凝胶对混合容器的包覆仅处于最小程度。通过这项技术,可以制备用于牛、猪和禽的添加药物的饲料。

该技术允许灵活地制备添加药物的饲料,并减少了清洁工作量。该产品不适合鱼类药剂;该药物仅分布于表层,且凝胶包覆层也不能阻止渗出。

在已公开专利申请 WO 01/07047 A2 中公开了将保幼激素类似化合物 3-(3',7'-二甲基-辛氧基)嘧啶溶解于毛鳞鱼鱼油 (capelin oil) 中,来包覆大西洋鲑用的普通鱼饲料球粒,用于控制水产动物中的甲壳纲动物的侵袭。该方法具有不需要附加密封工序的优点。该申请局限于油溶性物质。

还尝试过将活性物质以包嵌型或胶囊封装型引入到饲料中。

WO 89/12442 中涉及分层药物剂型的鱼类药剂。药物层由水和药基本上不可渗透的外层环绕,且它包含能提高产品味道和气味的物质,来刺激摄食。药物层包含药物和含水凝胶形成的载体物质。通过外层与加有药物的内层共挤压来制备所述剂型。提出了要求保护用于鲑科鱼(salmoniformes)的土霉素、氟甲喹和奥索利酸的剂型。药物很好地包封在该系统中,因而具有低的泄露趋向,并且是美味的。药物不得不在知道需要量之前预先制备。它也存在为避免交叉污染而要清洁挤压机的困难。

德国专利 DE 1974 1114 涉及兽医用颗粒、球粒或片粒,它具有含有药物的芯、耐酸但溶于中性或碱性 pH 值的内部包覆层,和对酸不稳定的、在中性或碱性介质中不溶解但可膨胀的外层包覆层。这些组合物适用于与饲料一起给鱼口服抗生素、疫苗等;将其置入水中后,活性剂在水中或胃中并不立即释放,而会在肠中释放。

这些药物的制备是冗长的;首先芯的制备必须通过将药物或疫苗与淀粉、乳糖、聚乙烯吡咯烷酮和水进行捏合,形成颗粒,以耐酸内层包覆该颗粒并干燥,接着以酸不稳定层包覆。

通过以上回顾,显然添加药物的饲料迄今主要由两种方法制备:在配制载体

之后，将活性物质涂覆在载体表面上，或是将载体成分与活性物质混合，从而在配制前将所述活性物质引入载体主体中。这两种方法的缺点如上面所详述。在现有技术中，没有在添加药物的饲料的制备中在载体配制之后将活性物质引入到载体整体中的已知工艺。在所有将活性物质施用到已配制的载体中的在先技术方法中，所得产物中的活性物质均处于表面上。

在这里使用的术语具有如下含义。

药物：用于治疗或预防疾病的物质，为避孕，为麻醉，为增加动物的抵抗力，或为影响它的交配。

饲料添加剂：为提高动物的生长效率、控制寄生虫、减少细菌感染、刺激某些酶、增加食欲、控制气胀病和饲料变坏而加入饲料中的物质。

配制的动物饲料：由天然的和/或合成的组分组成的饲料，相对于非配制的饲料和活体饲料(鱼，肉，植物，种子等)。

添加药物的饲料：含有药物和/或饲料添加剂的饲料。

药剂，生物活性物质/原料：药物和饲料添加剂。

吸附作用：吸附和吸收。

在传统家畜生产和水产业中，所需的药物和饲料添加剂的类型和数量不能始终被预先计划。对于宠物，也是这样。有许多因素会影响药剂的使用，如某一疾病的爆发，其类型和时间；必须治疗的动物的数量；预防性治疗的需要；孵化率，一胎产崽量，存活率；生长阶段和动物体重决定了剂量等。生物活性物质的服用增加了养殖成本；虚弱的、不健康的、有病的动物难于通过口服来摄取药物。未吃光的和未吸收的药物和饲料添加剂会污染环境。本发明的目的是以灵活的方式制备一种口服药物传递系统或饲料添加剂传递系统，该系统包含生物可利用形式的生物活性物质，优选其均一地吸收在一种美味载体整体中，该载体优选动物饲料。依照本发明，添加药物的饲料由配制的适合动物食用的多孔性饲料和药物来制备。在动物饲养场和水产业，饲料通常是现有的；药剂可以贮藏或从厂商那里容易地得到。另一方面，药物厂商、预混料厂商和饲料制造厂在定单到达时能以一种灵活的方式来生产添加药物的饲料。每单位饲料中含有的药剂量可根据需要剂量而变化。优选将药剂均一地分布于饲料中，不作为包覆层；因而饲料的适口性不会被改变。药剂被吸收到饲料中可以确保不会渗出或仅有不显著的渗出发

生。该制备方法使得可按实验室规模、中试规模和生产规模来制备。在任何规模中均使用封闭体系，这样杜绝了职业的和环境的危害。

发明内容

5 本发明涉及一种易摄取的和生物可利用的口服兽药传递系统和饲料添加剂传递系统，该系统包含优选均一地吸收在多孔载体整体中的药剂，该载体优选饲料，并能通过使该药剂的溶液与饲料混合来进行吸收，随后蒸发溶剂而简单地制备。该方法是灵活的，当发生对药剂的需求时，能够在实验室、中试和生产规模下来进行。该技术包括封闭系统，如旋转蒸发器、转鼓干燥器，这样职业的和环境的危害就能够杜绝。该产物能用作饲养动物和宠物的药剂，优选用于水产业。药剂被吸收到孔隙内；它粘附在饲料上，这样就不太可能泄漏到环境中。在那些载体中含有亲脂性的物质的情况下，低润湿性也延缓了药物的渗出。

10 本发明的第一方面，涉及一种口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统，该系统包含至少一种生物活性物质，所述生物活性物质至少以显著的程度吸收在一种载体的整体中，该系统可由以下步骤获得：

a) 将生物活性物质溶液和载体置于容器中；

b) 混合容器中物质足够时间使载体吸附生物活性物质溶液，这段时间足以使至少显著量的生物活性物质被吸附到载体中，优选10分钟至2小时，更优选20-30分钟；并且

20 c) 在保持混合的条件下蒸发溶剂至干燥。

在这里所用的术语“至少以显著程度/至少显著量的生物活性物质”意思是“至少40 w/w%，优选至少60 w/w%，更优选80 w/w%，甚至更优选90 w/w%并且最优选达到100 w/w%的活性物质”。

25 在这里需要指出的是，以前药剂在饲料中均一的分布只能通过饲料生产期间添加药剂来实现。依照本发明的新产物是一种添加药物的饲料，通过上述的制备方法，它包含被均一地吸收进入饲料基质主体中的活性物质，和通过将生物活性物质涂覆于配制的载体的表面上来制备的产物不同。而且，技术人员能够容易地从通过在配制前将活性物质与载体进行预混合来制备的产物和根据本发明制备的产物中发现区别，如根据它们之间活性物质分布模式的差异。

在本发明的优选实施方案中，生物活性物质是均一地被吸收到载体中。

在本发明的一种实施方案中，溶剂选自丙酮、甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、乙酸乙酯、卤化烃、水和活性物质的沸点小于或等于 120℃ 的任何溶剂以及它们的混合物。

5 在本发明的另一种实施方案中，溶剂在真空和/或在空气或氮气流中进行蒸发。

在本发明的进一步的实施方案中，混合用选自下列的容器进行：旋转蒸发器、混合容器、搅拌容器、转鼓式干燥器、真空鼓式干燥器和流化床。

10 在本发明的进一步优选的实施方案中，步骤 a) 到步骤 c) 在一个封闭体系中完成。

在本发明的进一步的实施方案中，口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统中的载体是一种多孔物质。

15 在本发明的进一步的实施方案中，口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统中的载体是一种配制的动物饲料，选自处于干、半湿或湿状态的饲料球粒、颗粒、挤出物、片粒、薄片和其它微粒状饲料。

在本发明的进一步的实施方案中，口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统中的载体是适合于动物的美味物质。

20 在本发明的进一步的实施方案中，口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统中的生物活性物质选自杀寄生虫剂、驱虫药、抗菌剂、抗应激剂、动物生长促进剂、抗炎剂、抗生素、激素、激素类似物、口服疫苗、维生素和任何其它药物，和任何制药学上可接受的它们的组合。

25 在本发明的进一步的实施方案中，口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统中的生物活性物质选自 17- α -甲基-睾九酮、17- α -乙基-睾九酮、17- α -甲基-二氢睾九酮、17- β -雌二醇、氟甲喹、奥索利酸、沙氟沙星、土霉素、磺胺地索辛、磺胺间甲氧嘧啶、奥美普林、磺胺甲氧嘧啶、氨比西林、青霉素、恩氟沙星、布舍瑞林、氟霉素、呋喃唑酮、庆大霉素、伊维菌素、hexaflumuron、左旋咪唑、甲硝哒唑、萘啶酸、硝碘酚腈、呋喃西林、吡咯米酸、链霉素、磺胺嘧啶、甲氧苄氨嘧啶、teflubenzuron、双氟苯隆、四环素、托比西林、阿苯哒唑、二环霉素、bicomycin、地美硝唑、多西霉素、氟苯哒唑、交沙霉素、卡那霉素、白霉素、林

可霉素、新生霉素、吡嗪酮、利福平、螺旋霉素、硫姆林、emamectin、红霉素、氟苯尼考、夫马洁林、西玛津、氧氟沙星、诺氟沙星、依诺沙星、环丙沙星、托氟沙星、benofloxacin、达氟沙星、恩氟沙星、奥比沙星和任何它们的制药学上的活性盐、酯和其他的衍生物和制药学上可接受的它们的组合。

5 在本发明的进一步的实施方案中，口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统中的生物活性物质是对于环境和/或操作人员的危险物质。

在本发明的进一步的实施方案中，口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统中的生物活性物质使用放射性同位素示踪。

10 在本发明的进一步的实施方案中，口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统具有优良的贮存稳定性。

在本发明的进一步的实施方案中，生物活性物质不从依照本发明的口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统中渗出或只有低的渗出。

在本发明的进一步的实施方案中，口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统是生物可利用的。

15 本发明的第二方面是一种制备如上面所述口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统的方法；包括以下步骤：

a) 将生物活性物质溶液和载体置入一个容器中；

b) 混合容器中内容物质一定时间来促进载体对生物活性物质溶液的吸附，这段时间足以使至少显著量的生物活性物质被吸附到载体中，优选 10 分钟至 2 小时，更优选 20-30 分钟；并且

c) 在保持混合的条件下蒸发溶剂至干燥。

在本发明方法的实施方案中，溶剂选自丙酮、甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、乙酸乙酯、卤化烃、水和活性物质的任何沸点小于或等于 120℃ 的溶剂，和它们的混合物。

25 在本发明方法的进一步的实施方案中，溶剂在真空和/或空气或氮气流中进行蒸发。

在本发明方法的进一步的实施方案中，混合用选自下列的容器进行：旋转蒸发器、混合容器、搅拌容器、转鼓式干燥器、真空鼓式干燥器和流化床。

在本发明方法的进一步的实施方案中，步骤 a) 到步骤 c) 在一个封闭体系中完

成。

本发明的第三方面是如上述口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统作为药物或饲料添加剂的应用。

在本发明的进一步的实施方案中,如上述的口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统应用于水产业,尤其是鱼类养殖,家禽、猪、牛的养殖,以及用于宠物。

提供下列实施例是为了说明而不是限制本发明。

分析方法

HPLC 系统包括两个 125 型的可编程的泵,一个 406 型的数模界面 (digital-analog interface), 于 254nm 进行检测的 155 型紫外检测器(Beckman Instruments, Irvine, CA), 一个 Pharmacia FRAC-100 型组分收集器和一个装有 Gold Version 8.10 Gold 软件系统的 IBM 55X 型 PC 电脑。

甲基睾九酮是通过反相HPLC进行测定,使用3 μ m C18柱(Supelco LC18-DB 15cm x 4.6 mm)和梯度洗脱程序。流动相 A 是 40 倍体积甲醇、30 倍体积乙腈和 50 倍体积水的混合物。流动相 B 包括 40 倍体积甲醇、30 倍体积乙腈和 10 倍体积的水。程序是: 0-5 分钟 100% A; 5-12 分钟线性梯度至 40% A, 60% B; 12-15 分钟线性梯度至 100% A; 15-20 分钟 100% A。流动速率设定为 1 mL/分钟。在这些条件下, 甲基睾九酮的峰值出现在 11 分, 与基质成分和可能的代谢物相分离。

氟甲睾的分析在同样的 HPLC 系统上以同样条件进行等度洗脱。流动相由 60 倍体积的缓冲液(20 mM 磷酸钾, pH 3.2), 20 倍体积的甲醇和 20 倍体积的四氢呋喃组成。C18 柱是 Beckman Ultrasphere IP 的, 25 cm x 4.6 mm。氟甲睾的峰值出现在 9.5 mm。

通过液体闪烁计数计算, 将 1 分钟内 HPLC 流出的部分收集到 6mL 的小瓶中。

用于测定甲基睾九酮的校准曲线通过 17 α -甲基睾九酮和流动相中可能的代谢物 4-雄烯-17 α -甲基-11 α , 11 β -二醇-3-酮和 δ -4, 6-雄二烯-17 α -甲基-17 β -醇-3-酮的标准溶液来制备。

为测定氟甲睾, 使用了由氟甲睾和 7-羟基-氟甲睾的标准溶液得出的校准曲

线。

在 Beckman 液体闪烁系统 LS 6000IC 中进行了放射性分析；闪烁混合液是 ScintiVerse E (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ)。

5 血浆样品的分析采用同位素稀释法。将含有已知数量的分析物(17 α -甲基睾酮或氟甲睾酮和它们可能的代谢物)的冷 spike 加入放射性样品中,并通过 HPLC 的量化和相应最高的放射活性计算出比活。每克样品中分析物的量(W_x)可使用方程式 $W_x = W_f / ((S_o/S_x) - 1) W_s$ 计算出来, W_f 为加入的未标记分析物的量, W_s 为血浆样品的重量, S_o 为在未标记分析物加入前样品中分析物的比活(假定 S_o 值等于加药饲料的比活), S_x 为用冷 spike 稀释后分析物的比活。 S_x 即 $A_{dpm} / A_{分析物}$, 其中 $A_{分析物}$ 是以 HPLC 测定时使用校准曲线时确定的分析物的量, A_{dpm} 是在相应 HPLC 洗脱部分的放射活性的量。

鱼类

15 虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*), 均重 500 g, 雌雄各半, 选自 1000L 玻璃纤维养鱼池。将鱼单个地养在 75L 的矩形玻璃缸中, 该缸中以始终保持恒定温度状态在 $15 \pm 1^\circ\text{C}$ 的流动水运转。光周期维持在 12 小时光照和 12 小时黑暗。每日以 Rangen 湿软鲑鱼饲料(Rangen Feed, Buhl, ID)以 0.5 或 1% 体重比率喂鱼, 直到药物或外科试验前。

实施例 1

为口服给药制备的甲基睾酮饲料

20 在饲料中引入的活性物质的数量通过日剂量包括在每日饲料配给量中的方式计算。

25 在 1L 圆底烧瓶中, 将 1.9970g 17 α -甲基睾酮(Research Plus Inc. Bayonne, NJ)溶于 300mL 丙酮。为在饲料制备物中进行放射性同位素示踪, 加入 3.69mg 的 17 α -甲基[4- ^{14}C]-甲基睾酮(Amersham International Plc Buckinghamshire, UK)。

将 105-110g Rangen 湿的鲑鱼饲料(4 mm)通过 2 mm x 1 mm 铜金属丝网筛。这样做主要是为了将过细的鱼不喜欢摄食的饲料颗粒分离。将 100 g 筛过的饲料加到溶液中。将圆底烧瓶置于 Buchi 旋转蒸发器上, 在大气压下缓慢旋转 20 分钟(ca. 60 rpm)。保持 35-40 $^\circ\text{C}$ 水浴。20 分钟后, 连接真空吸尘器对溶剂进行完全

蒸发。其后将圆底烧瓶从旋转蒸发器移开。

实施例 2

带有额外干燥的口服甲基睾酮饲料的制备

5 依照实施例 1 制备加药饲料小球，在从旋转蒸发器移开圆底烧瓶后，将氮气从烧瓶中清除。

甲基睾酮饲料产物的重量为 96.64g。

实施例 3

加药饲料小球的分析

a. HPLC 测定的甲基睾酮的含量

10 在 Branson 2200 声波降解浴室中，以 20mL 甲醇在带帽小瓶中对 3 个 1g 的所制备饲料进行萃取。声波超声持续 60 分钟或直至小球全部悬浮。用冰将水温保持在低于 40°C。上清液通过 0.22 微米尼龙微离心分离器过滤器过滤，并以同样溶剂稀释(1 倍体积甲醇与 1 倍体积水的混合物)。将样品注入 HPLC 柱上。

15 使用校准曲线，求出甲基睾酮的含量值。3 个样品的均值为 $20.02 \pm 0.604 \text{mg}$ 甲基睾酮/g 饲料(CV = 3.02%)。

b. 通过液体闪烁计数得出的甲醇提取物中 ^{14}C -甲基睾酮的含量

由 3a. 中得到的甲醇萃取物可以直接算出每 100 μL 萃取物的总放射能。相应饲料重量中的 3 个萃取物的均值为 $16.52 \times 10^6 + 0.270 \times 10^6 \text{ dpm/g}$ 饲料(CV = 1.63%)。

20 c. 回收率

甲基睾酮的回收率通过以甲基睾酮总用量 2000.7mg(实施例 1 中的标记的和未标记的)和产物中的数量为基础计算得出，例如 $96.64 \text{ g} \times 20.02 \text{ mg/g} = 1934.7 \text{ mg}$ 。这样所用药的 96.7% 可以被回收。

实施例 4

25 从加药饲料中渗出的甲基睾酮的测试

取试验 1 中所制备的甲基睾酮总含量为 20.02mg 的饲料 1 g，加入含有 20mL 15°C 蒸馏水的锥形烧瓶中。于水溶上搅拌水并保持于 15°C。在将小球加入水中后，按下列时间取水样：5、15、30 和 60 分钟。取 0.1mL 样品注入 HPLC 柱测定浓度。水中甲基睾酮的数量可以相对于饲料量的比率(%)表示。数据见

表1.

表1: 甲基睾丸酮从加药饲料中的渗出

将饲料浸入水中后经过的时间(分)	渗出量%
5	0.208
15	0.416
30	0.832
60	1.71

从表1中列出的数据可明显看出, 1小时后仅有很小数量的活性物质从加药的配制饲料中渗出到环境中。

5 实施例5

使用加药饲料喂鱼

在每天定量给料中, 加药饲料先于未加药饲料给予。

加药饲料的每日用量(MF)的计算如下:

$$MF(g) = \text{日剂量}(mg/kg) \times \text{体重}(kg) / C_M,$$

其中

C_M = 饲料中的药物浓度(mg/g)。

总的每日饲料配给量(TF)为:

$$TF(g) = N \times \text{鱼体重}(g)$$

其中

15 $N = 0.005$ 或 0.01 。

未加药饲料量(NF)为:

$$NF(g) = TF - MF.$$

鱼容易摄食到加药饲料, 通常在加药饲料被投入养鱼缸后 5-10 分钟内被鱼摄食。其后再提供未加药饲料。

20 每千克体重的虹鳟鱼可获得 30 mg 17 α -甲基睾丸酮的剂量。

实施例6

生物利用度研究

为研究经加药传递系统的 17 α -甲基睾丸酮的生物利用度, 对 5 条鱼每天给予每千克鱼体重 30mg 甲基睾丸酮的单一口服剂量。鱼在投喂后 5 分钟内自动食入

加药饲料。定量给药后,分别在给药后 30 分钟、1、2、4、8、12 小时、1、2、4、6 天通过事先嵌入的管子连续地从鱼体收集血样。

将甲基睾酮溶解于 40 倍体积乙醇与 60 倍体积分水的混合液中,用来动脉内注射。5 条鱼接受了每千克体重 20mg 甲基睾酮的单一动脉注射。分别在给药后 30 分钟、1、2、4、8、12 小时、1、2、4、6 天连续地收集血样。

每次取血样后将等量的改性 Teleost 盐水经动脉内注射入鲑鱼体内。

甲基睾酮的口服生物利用度(73.1%)的测定是使用在相应动脉内(i. a.)和口服血浆(p. o.)的浓度-时间曲线下的面积来进行的,可用等式 $F(\%) = 100 \times \text{AUC}(p. o.) \times \text{剂量}(i. a.) / \text{AUC}(i. a.) \times \text{剂量}(p. o.)$ 来描述,其中 AUC (p. o.)和 AUC (i. a.) 是由经计算的浓度-时间剖面曲线得来的均值(n=5)。

实施例 7

甲基睾酮饲料的贮藏稳定性

测试依照实施例 1 制备的甲基睾酮饲料的贮藏稳定性。将等份的饲料放入 3 个已称皮重的结晶器皿中,覆盖并在 4℃ 下贮存。以其中两个器皿中内容物来控制 4℃ 贮存期间的重量损失。在添加药物的饲料制备后的下列时间检查重量损失: 3 天, 1、3、4、9 周, 3、7 个月。贮存 7 个月后,重量损失分别为 0.123% 和 0.091%。在饲料新制备时和制备后不同时间,检测饲料中甲基睾酮的浓度。每次测量 3 个 1g 饲料样品,如实施例 3 所述检测饲料的一致性。表 2 显示了这 3 个样品的均值。

表 2: 甲基睾酮饲料的贮存稳定性

饲料制备后经过的时间	甲基睾酮含量(mg/g)
0	20.02±0.604
4 周	19.91±0.652
3 个月	18.46±0.795
7 个月	18.72±0.748

经 7 个月贮藏后甲基睾酮的浓度测定为 1.30mg/g 或比饲料制备日时小 6.49%。将这些值与每日测定的平均波动对比,该减少值是每日样品-样品波动平均值的大约两倍。

实施例 8

氟甲喹饲料的制备

沿用实施例 1 和 2 的步骤来制备氟甲喹饲料。未标记的氟甲喹来自于 Sigma Chemical Co. St. Luis, MO; $\{2-^{14}\text{C}\}$ - 氟甲喹由 Amersham International Plc Buckinghamshire, UK 提供。使用溶解于 300mL 丙酮中的、总量为 0.9004g 的标记和未标记的氟甲喹，来处理 100g Rangen 湿鲑鱼饲料(4 mm)。产物中氟甲喹的浓度为 8.70 ± 0.219 mg 氟甲喹/g 饲料。

实施例 9

氟甲喹饲料的口服

给予虹鳟鱼 12 mg 氟甲喹/kg 体重。如试验 5，在服用试验的每天，将添加药物的饲料先于未添加药物的饲料给予。鱼在 5-10 分钟内容易地摄食氟甲喹饲料。

本发明相对现有技术的优点如下。

通常在饲料制备期间直接将兽药和饲料添加剂(药物)加入到饲料中，或在后续的步骤中将药物加入到饲料产物中。

当在生产期间将药物与饲料成分混合时，在混合、捏合、挤出、造粒和其他工序中，由于施加的或产生的热量，会使药物/饲料添加剂发生降解。本发明提供了一种药物传递系统，其中优选将药物以一种稳定的形态均一地分布到多孔饲料整体中；使用药物溶液对多孔载体的温和处理，可实现至少 90-97% 的药/饲料添加剂回收率。

在饲料制备期间将药物加入到饲料成分中的另一个缺点是，整条生产线被药物/饲料添加剂污染。它包括难于清洗这些设备，如混合机、挤压机和其他造粒机器。依照本发明，当在一个独立的步骤中用药物溶液来处理饲料时，只有指定的设备与活性成分接触。而且，真空蒸发器玻璃瓶或真空干燥器鼓的清洗是相对简单的工序。

在饲料制备期间向饲料中加入药物的另一个缺点是，药物传递产物的质量和数量在其一旦制备出来后就不具有灵活性。本方法具有很大的灵活性：当需要出现时，可将适当类型和数量的药物以快速、简单的方法加入到所需的载体中。具有优选均一地吸收到饲料载体中的药物的药物传递系统可在农场、饲料加工厂中制备出来，或通过预混料和药厂商来制备。

在以前的技术中，当药物加入到已准备好的饲料中时，该产品是一种由饲料核心包覆一层药物组成的药物传递系统。通常，虚弱的、不健康的、有病的动物不愿摄食这种有药味的饲料。因而，冗长的和更昂贵的传递系统(注射，贴剂)是可供选择的方案。这样的方法的应用通常是被限制的；如在动物养殖中，或由于它们的副作用。依照本发明，药物不积聚在表面；动物获得具有通常饲料味道的适口的药物传递系统。如果将其作为饲喂方案时的初始部分使用，则动物很可能会消费至少那些添加药物的初始饲料部分。

以药物包覆饲料的另一个缺点是，外层容易被机械地损坏，这样剂量就难于控制。在水产业中，表面包覆层很容易导致药物渗出到水中。这不仅导致给药剂量的减少，还是水污染的一个来源。为避免对人类也有害的、药物对生态系统的污染，引入新型的鱼药物已作为一种解决方法。网状物也已用在鱼类养殖中来收集未摄取的药物。在另一种情况下，实现了药物的重新漂浮。重新漂浮单独不能保证药物摄入的增加，也不能保护环境不受污染。依照本发明，从饲料载体中渗出的药物可以忽略，因而该产物对环境是无害的。如果适宜，可使用网状物收集未吃掉的添加药物的饲料。

以前的将药物加入到饲料中的方法，包括在开放的混合机，如水泥搅拌机中混合饲料和药物，或将药物溶液或悬浮液喷雾到饲料上。这两种方法对环境和操作人员都是有害的。本发明提供一种方法，可在封闭系统中完成，这样对环境和职业上都是安全的。当使用了放射性同位素标记的化合物如为了试验目的时，封闭系统的重要性就更显著了。

使用喷雾来进行药物对饲料的包覆时，不能确保药物的均一分布。本方法导致药物能优选均一地吸收到载体中。

可容易地实现从小规模的旋转蒸发器的按比例增加，如通过使用 20mL 到 50L 容积的 Buchi 真空蒸发器，和更大批量的真空转鼓式干燥器。

由前述，应理解，虽然为了说明的目的在此描述了本发明的具体实施方案，但在不偏离本发明的实质和范围的条件下可做出各种变化。因此，本发明不限于已公开的实施方案或实施例，其只由所附权利要求书来限定。

国际初步审查报告附件的中文译文

申请人请求以国际申请 WO 2004/039172A1 的国际初步审查报告附件的权利要求 1-10 作为审查基础,特提交权利要求书全文替换页第 1-2 页。

权 利 要 求 书 (34 条修改)

1、制备口服兽药传递系统和/或饲料添加剂传递系统的方法，其中所述载体是一种配制的动物饲料，选自处于干、半湿或湿状态的饲料球粒、颗粒、挤出物、片粒、薄片和其他颗粒状饲料，所述载体是多孔物质，并且至少一种生物活性物质以至少显著量吸附于载体的整体中，该方法包含以下步骤：

a) 将生物活性物质溶液和载体置入一个容器中；

b) 混合容器中物质一定时间来促进载体对生物活性物质溶液的吸附，这段时间足以使至少显著量的生物活性物质被吸附到载体中；并且

c) 在保持混合的条件下蒸发溶剂至干燥。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其中至少一种生物活性物质被吸附在载体整体中，该方法包括下列步骤：

a) 将生物活性物质溶液和载体置入一个容器中；

b) 混合容器中物质 10 分钟至 2 小时，优选 20 分钟至 30 分钟，来促进载体对生物活性物质溶液的吸附；并且

c) 在保持混合的条件下蒸发溶剂至干燥。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述溶剂选自丙酮、甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、乙酸乙酯、卤化烃、水和活性物质的任何沸点小于或等于 120℃ 的溶剂，和它们的混合物。

4、根据权利要求 1-3 所述的方法，其中所述溶剂在真空和/或空气或氮气流中蒸发。

5、根据权利要求 1-4 所述的方法，其中在选自旋转蒸发器、混合容器、搅拌容器、转鼓式干燥器、真空鼓式干燥器和流化床的容器中进行混合。

6、根据权利要求 1-5 所述的方法，其中步骤 a) 到步骤 c) 在封闭体系中完成。

7、根据权利要求 1-6 所述的方法，其中所述生物活性物质选自杀寄生虫剂、驱虫药、抗菌剂、抗应激剂、动物生长促进剂、抗炎剂、抗生素、激素、激素类似物、口服疫苗、维生素和任何其它药物，和任何制药学上可接受的它们的组合。

8、根据权利要求 1-7 所述的方法，其中所述生物活性物质选自 17- α -甲基-睾九酮、17- α -乙基-睾九酮、17- α -甲基-二氢睾九酮、17- β -雌二醇、氟甲喹、奥索

利酸、沙氟沙星、土霉素、磺胺地索辛、磺胺间甲氧嘧啶、奥美普林、磺胺甲噁啶、氨比西林、青霉素、恩氟沙星、布舍瑞林、氟霉素、呋喃唑酮、庆大霉素、伊维菌素、hexaflumuron、左旋咪唑、甲硝哒唑、萘啶酸、硝碘酚脒、呋喃西林、吡咯米酸、链霉素、磺胺嘧啶、甲氧苄氨嘧啶、teflubenzuron、双氟苯隆、四环素、托比西林、阿苯哒唑、二环霉素、bicomycin、地美硝唑、多西霉素、氟苯哒唑、交沙霉素、卡那霉素、白霉素、林可霉素、新生霉素、吡嗪酮、利福平、螺旋霉素、硫姆林、emamectin、红霉素、氟苯尼考、夫马洁林、西玛津、氧氟沙星、诺氟沙星、依诺沙星、环丙沙星、托氟沙星、benofloxacin、达氟沙星、恩氟沙星、奥比沙星和任何它们的制药学上的活性盐、酯和其他的衍生物和制药学上可接受的它们的组合。

9、根据权利要求1-8所述的方法，其中所述生物活性物质对于环境和/或操作人员是危险物质。

10、根据权利要求1-9所述的方法，其中所述生物活性物质使用放射性同位素示踪。