

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 35/22 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 00819918.3

[45] 授权公告日 2006 年 1 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1234372C

[22] 申请日 2000.10.20 [21] 申请号 00819918.3

[86] 国际申请 PCT/IN2000/000106 2000.10.20

[87] 国际公布 WO2002/032436 英 2002.4.25

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.25

[71] 专利权人 科学和工业研究委员会

地址 印度新德里

[72] 发明人 苏曼·普里特·辛格·哈努贾

苏希尔·库马尔

阿吉特·库马尔·沙萨尼

贾伊·尚卡尔·阿里亚

马亨德拉·潘杜朗·达罗卡

莫尼卡·辛格 普拉奇·辛哈

松亚·阿瓦斯蒂

苏巴什·钱德拉·古普塔

维韦·库马尔·古普塔

马丹·莫汉·古普塔

拉姆·基肖尔·维尔马

斯韦塔·阿加瓦尔

苏尼尔·巴尔克里什那·曼辛格卡

苏雷什·哈里布浩·道利

审查员 周 静

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 樊卫民 杨 青

权利要求书 3 页 说明书 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称

得自牛尿馏出物('GO - mutra')的生物活性级分作为抗感染药、抗癌剂和营养物的生物增强剂的应用

[57] 摘要

本发明涉及一种包含有效量的作为生物利用度促进剂的得自牛尿馏出物的生物活性级分和可药用添加剂的药物组合物，其中所说的可药用添加剂选自抗癌化合物、抗生素、药物、治疗和营养物质、能靶向于活体体系的离子和类似分子。

- 5 1. 一种包含有效量的作为生物利用度促进剂的牛尿馏出物和可药用添加剂的药物组合物，其中所说的可药用添加剂选自药物、治疗和营养物质、可靶向于活体体系的离子和分子。
2. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述的药物选自抗生素和抗癌剂。
- 10 3. 如权利要求 2 所述的组合物，其中所述的抗生素选自抗真菌剂、抗 TB 剂和抗菌剂。
- 15 4. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的牛尿馏出物被用作生物利用度促进剂直接用于抗癌治疗中或与抗癌剂一起用于抗癌治疗中。
- 20 5. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的牛尿馏出物被用于 TB 治疗，该 TB 治疗包括与异烟肼和其它抗结核剂结合进行的多重药物抗结核的治疗。
- 25 6. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的牛尿馏出物被用于真菌感染的抗真菌治疗。
7. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的生物利用度促进剂有助于化合物通过膜的转运和在靶部位具有更好的效力。
- 30 8. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的抗生素选自喹诺酮类抗生素、氟代喹诺酮类抗生素、萘啶酮酸、利福平、四环素、氨苄西林。

9. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的抗生素、离子和分子是异烟肼和过氧化氢。

5 10. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的生物利用度促进剂通过增加效力而有助于抗生素和其它的分子在靶部位更好的发挥作用。

10 11. 如权利要求 6 所述的组合物，其中抗真菌治疗中使用的杀真菌剂是吡咯类、克霉唑、制霉菌素、两性霉素。

12. 如权利要求 6 所述的组合物，其中真菌覆盖性感染是由霉菌、念珠菌和酵母菌引起的。

15 13. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的活体体系是细菌、真菌。

14. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所用的牛尿(Go-mutra) 馏出物的浓度在 0.001 μ l/ml 至 100 μ l/ml 的范围内。

20 15 如权利要求 1 所述的组合物，其中所说的牛尿(Go-mutra)增强了分子、药物穿过半透膜和哺乳动物肠膜的膜渗透性，并且可被用于增强分子的肠转运和通过其它生物功能膜的转运。

25 16. 牛尿馏出物作为一种或多种营养物、抗生素、抗感染药、抗菌剂和抗癌剂的生物增强剂和生物利用度促进剂的新应用。

17. 如权利要求 16 所述的应用，其中所说的抗菌剂选自喹诺酮类抗生素、利福平、四环素和氨苄西林。

30 18. 如权利要求 16 所述的应用，其中所说的抗菌剂是选自异烟

胍、吡嗪酰胺、乙醇丁胺。

19. 如权利要求 16 所述的应用，其中所说的抗癌剂选自紫杉醇。

5 20. 如权利要求 16 所述的应用，其中所说的牛尿馏出物被用作生物利用度促进剂直接用于抗癌治疗中或与抗癌分子一起用于抗癌治疗中。

得自牛尿馏出物（‘Go-mutra’）的生物活性级分作为
抗感染药、抗癌剂和营养物的生物增强剂的应用

5

技术领域

本发明涉及牛尿馏出物作为生物活性分子的活性增强剂和利用度促进剂的绝对新颖性的应用，其中所说的生物活性分子包括抗感染药和抗癌剂。以抑制或促进一种生物功能的形式来表达任何形式的活性的分子在本发明中被称为生物活性分子，例如抗生素、药物、营养物（nutraceuticals）、心血管药物、肝保护剂、神经滋补剂等等。在增加生物活性分子吸收效率的同时，本发明在显著减少抗生素、药物和抗癌剂的剂量方面具有直接的意义。

10

15

背景技术

20

25

30

在印度草医学中，暗示牛尿可以改善一般的健康。但是，从来没有对任何单独应用进行系统地试验。申请人对制剂中的这种组分感到很好奇并且就其提出了很多疑问；是该牛尿组分本身具有任何活性还是其不具有任何活性但是可增前该制剂中其它组分的活性？在牛尿中所存在的组分是什么？该尿是否包含有益的微生物？得自尿的降解产物是否有益？为了回答这些问题，申请人得到了“Kamadhenu Arka”——得自“Go Vigyana Anusandhana Kendra” Nagpur, India 的尿馏出物。这是建议可用于饮用以改善一般的健康并被进行销售的尿馏出物，其被分布在不同大小的瓶子中。申请人在无菌的条件下在 Luria 琼脂和液体培养基上对该尿进行了试验，并没有发现任何微生物生长。为了测试其是否会抑制不同微生物的生长，使大肠埃希氏杆菌（*Escherichia coli*）和包皮垢分支杆菌（*Mycobacterium smegmatis*）在存在或不存在牛尿馏出物的情况下，在 20 至 40℃ 的温度范围内的不同温度下进行生长，在菌落计数中没有观察到显著差异。令人吃惊地是，相同的馏出物增强了抗生素对这些细菌的作用，这导致了本发明。本

发明的新颖性在于通过精确的试验所揭示的事实，即仅仅在字面上表示为毫微至微摩尔水平的浓度范围内才可以获得该增强作用和效力。并且当在该制剂或组合物中使用更高的浓度/剂量时并不出现这种活性（这些活性）。这是为什么检测不到牛尿(Go-mutra)的该类有价值的潜能的原因。因为由于各种因素如有效吸收、转运到靶部位、滞留时间、流出泵的运动、代谢等等原因而导致这些抗生素不能有效地用于或靶向于有感染性的生物体，所以每年有数百万剂量的抗生素消耗被浪费。因此，我们所用的这些药物中的很大部分被浪费掉了，仅仅有很少量的百分比被靶向于有传染性的微生物。该未被利用数量的药物/抗生素作为促进寄生物和其特优种出现耐药性的选择压力而成为了机体和环境的负担，从而最终导致抗生素抵抗微生物的失败。这也是产生副作用、疾病和在老龄人群中更尖锐的预期寿命下降的原因。能减少药物剂量的方法之一是在两种治疗剂之间产生协同作用。但是，如果二者都具有抗生素性质，则对于微生物的连续选择压力问题仍可能继续存在。因此，申请人想到了使用不杀菌但当存在药物或活性分子时能增强其活性和利用度（生物增强剂）的牛尿。这种方法在减少抗生素或药物的剂量同时平衡对抗了该选择压力以将副作用降到最低，这也具有很高的商业重要性。

20 本发明是有计划实验的结果，提供了一种在不同的制剂中用‘牛尿馏出物’改善抗生素、药物以及其它分子的生物活性和生物利用度的方法。

25 营养物的生物利用度和增强抗生素的作用是与人类、植物以及动物的健康有关的，因此预期本发明的组合物和方法也能用于农业和兽医实践中。

30 认为牛尿(Go-mutra)是具有一般健康改善能力的最有效的动物来源的物质/分泌物，但是这的确需要通过科学试验来进行证明。因此，申请人认为值得对其进行系统地考虑并通过体外和体内试验来确定该

价值的分子基础。因为这种性质使得其成为一种十分有用的天然物质，所以申请人首先举例探索了其是否包含任何的药物促进剂元素。在近日中，已经对作为一种生物利用度增强剂的“胡椒碱”进行了描述(美国专利 5,616,593 和 5,972,382)。因此，时至今日，有文件证明的一种已知的生物利用度增强剂是胡椒碱，并且已经在下面的现有技术中对一系列涉及这种化合物的发明进行了描述。

本发明的公开

主要目的是要提供该生物活性级分作为生物增强剂和生物利用度促进剂的新应用。

本发明的另一个目的是要提供一种用牛尿馏出物的活性级分改善抗生素、药物和其它分子的活性和生物利用度的方法。

本发明的另一个目的还在于要提供一种从牛尿中提取该活性级分的方法。

本发明的概述

本发明涉及已知的可大量获得的牛尿馏出物作为靶目标处抗生素作用增强剂的新应用。本发明的分子有助于抗生素通过动物细胞、革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌内细胞膜的吸收。通过使用牛尿在 40-50℃下的馏出物和其浓缩物也可以获得类似的活性，该浓缩物可被冷冻干燥并被在进一步应用前进行溶解。此外，得自水牛、骆驼、鹿的尿馏出物也可以提供类似的生物利用度活性。

附图的简要说明

图 1 表示了牛尿(Go-mutra)馏出物的 HPLC 特性

本发明的详细描述

我们在这里重点是要寻找一种具有高效的生物增强作用的来源丰

富的物质。此外，申请人所寻找的性质是对几乎不能获得的天然抗癌物质“泰素”（紫杉醇）的生物增强，这种天然抗癌物质是由紫杉树(紫杉属 (Taxus spp.))以极微小的数量所产生的物质，因此一直是一种仅可有限获得的分子。牛尿馏出物可增强不同抗生素对细菌的杀灭活性。更重要的是其可明显增强对乳腺癌细胞系 MCF-7 的细胞分裂抑制活性。

在本发明的一个实施方案中，一种药物组合物包含有效量的作为生物利用度促进剂的牛尿馏出物和可药用添加剂，其中所说的可药用添加剂选自抗癌化合物、抗生素、药物、治疗和营养物质、能靶向于活体体系的离子和类似的分子。

在另一个实施方案中，牛尿馏出物被用作生物利用度促进剂来直接用于抗癌治疗中或与其它抗癌分子一起用于抗癌治疗中。

在又一个实施方案中，牛尿馏出物被用于真菌感染的抗真菌治疗中。

在又一个实施方案中，该抗真菌药物是吡咯类、克霉唑、制霉菌素 (mystatin)、两性霉素以及类似的物质。

在又一个实施方案中，真菌覆盖性感染 (fungi covering infections) 是霉菌 (mycetial)、念珠菌、酵母菌或其它的杀真菌化合物。

在又一个实施方案中，牛尿馏出物被用于 TB 治疗，该治疗包括与异烟肼和其它的抗结核剂结合进行的多种药物抵抗肺结核的治疗。

在又一个实施方案中，该生物利用度促进剂有助于化合物通过膜的转运和在靶部位具有更强的效力。

在又一个实施方案中，该抗生素是喹诺酮类抗生素、氟代喹诺酮类抗生素如萘啶酮酸和其它物质如利福平、四环素、氨苄西林以及类似化合物。

5 在又一个实施方案中，该抗生素、离子和类似化合物是异烟肼和过氧化氢。

在又一个实施方案中，该生物利用度促进剂通过增加功效而有助于该抗生素和其它分子在靶目标处更好的进行作用。

10

在又一个实施方案中，该活体体系可以是细菌、真菌或任何活体细胞。

15 在又一个实施方案中，该抗菌剂选自喹诺酮类抗生素、利福平、四环素和氨苄西林。

在又一个实施方案中，该牛尿(Go-mutra) 馏出物在 0.001 μ l/ml 至 100 μ l/ml 的范围内。

20 在又一个实施方案中，所使用的被冷冻干燥的活性级分在 0.1 μ g/ml 至 100 μ g/ml 的范围内。

在又一个实施方案中，该生物活性级分将抗菌剂、抗癌剂以及抗结核剂的活性增强了 2 至 80 倍。

25

在又一个实施方案中，该生物活性级分将抗菌剂的活性增强了 2 至 80 倍。

30 在又一个实施方案中，该抗菌剂是选自异烟肼、吡嗪酰胺以及其它类似化合物的抗结核剂。

在又一个优选的实施方案中，该生物活性级分将抗结核剂的活性增强了 2 至 20 倍。

5 还是在本发明的另一个实施方案中，该抗癌剂选自紫杉醇(泰素)。

还是在本发明的另一个实施方案中，该生物活性级分将抗癌剂的活性增强了 2 至 20 倍。

10 我们所进行筛分的方法包括所设计的如下所述的特定的生物测定。在本发明中所用的细菌和真菌菌株是从 Institute of Microbial Technology (IMTECH), Chandigarh 购得的，其具有与所提及的 ATCC 菌株相当的性质。

15 1. 抗感染剂的生物增强试验

a) 在液体培养基和圆盘扩散试验中，用大肠埃希氏杆菌(ATCC 10536 的等同物)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (ATCC 6015 的等同物)和包皮垢分支杆菌(ATCC 10231 的等同物)对抗生素的最低抑制浓度(MIC)进行测定。

20 b) 将 1/4、1/3、1/2 的 MIC 浓度和等于 MIC 浓度的抗生素物质单独加入到圆盘上和液体培养基中并将其与各种浓度的试验化合物一起加入到圆盘上和液体培养基中以便于对比较抑制作用进行评估。

c) 与单独使用的抗生素进行比较，根据对细菌生长所表现出来的增强的抑制作用(在圆盘扩散中有大范围的抑制区域和在液体培养基试验中较低浓度的活性)，将表现出显著的优势或更高的活性的这些组合挑选出来以进行进一步的试验。

25 d) 在液体培养基试验中，通过对在特定处理中的有活力细胞的计数来对该活性进行定量，并且转化成与将抗生素/药物单独使用时相比组合所产生的细胞杀伤百分数增强倍数。

30 e) 进行预处理试验以测定该化合物是需要与抗生素一起使用来

增强其活性还是在抗生素进行处理后或处理前将其撤出会更有利。为此，将该细胞用化合物处理 4 至 8 小时，然后通过离心并用无菌水进行洗涤而来使其不含该化合物。然后再如步骤 b 至 d 所述的那样用抗生物来对其进行处理。

5

2. 抗癌剂的生物增强试验

a) 在 MEM 介质中，在 24 孔板的孔中，将 MCF-7 (得自 National Center for Cell Sciences (NCCS)的乳腺癌的商品化的细胞, Pune)以约 0.1×10^6 个细胞的密度进行培养。

10

b) 在 18 小时后，将各孔中的介质用新鲜的介质所取代。

c) 就在进行介质置换后，以所需浓度向不同的孔中加入该试验化合物。

d) 在 36 小时后对于细胞计数的观测结果进行记录，为此需要进行如下的步骤。

15

i. 将介质从这些孔中除去。

ii. 将这些孔用 1 ml 的 PBS(磷酸盐缓冲盐水)进行冲洗。

iii. 向各孔中加入 500 μ l 新配制的胰蛋白酶(在 PBS 中 0.1%)溶液。

20

iv. 在 30 秒后除去该胰蛋白酶溶液并对该平板进行轻轻的叩击直至该细胞从平板的表面上释放下来。

v. 向其中加入 1 ml 新鲜的 MEM 生长介质并用一根吸管进行搅动以获得一种细胞混悬液。

vi. 将 10 μ l 的细胞混悬液放到血细胞计数器上并在该计数室上放置一块盖玻片。

25

vii. 在 5 个大的正方形中对有活力的细胞数目进行计数，并且从 5 个显微区域进行读数以测定均值。

viii. 然后计算最初样品中的细胞计数（每 ml 的滴度），将其记为平均读数 $\times 10^3$ 。

30

极限必需培养基（MEM）的组成：100 ml

MEM 粉末(Sigma-Aldrich, USA) = 0.96 g

HEPES 缓冲剂(Sigma-Aldrich, USA) = 0.26 g

碳酸氢钠 = 0.22 g

青霉素 G = 10 mg

5 链霉素 = 20 mg

庆大霉素 = 5 mg

胎牛血清 = 15 ml

胎牛血清 = 15 ml

蒸馏水 = 85 ml

10

3. 通过生物学膜的生物利用度试验

a) 使用专门设计的由两部分（相反 L 型）所组成的玻璃的 U-管，该管的 L-型的一个开口末端是锥形渐尖的以便于与另一个 L-管的非锥形渐尖的末端相配(图 1)。

15 b) 将山羊肠（最初部分）的膜铺平并进行固定以作为当将两个 L-管连接起来时两个末端之间的屏障，通过将两个 L-管连接起来而形成来一个 U-管。

c) 然后向两侧加入高度/水平相等的无菌蒸馏水。向该供给管（锥形渐尖的）中加入抗生素/化合物，并且通过分光光度计，使用 UV 来对分子的转移进行观察，并且通过在所规定的波长下，通过获取 OD 来观测各分子的最大吸收。

20

实施例

在说明增强剂作用的下面的步骤中，申请人用如上所述的方法对不同的抗生素单独使用和与试验组分(牛尿馏出物)联合使用时对细菌的杀灭活性进行了实验。在下面的实施例中对这些试验进行了描述。当细菌在存在该化合物的条件下进行生长时，没有观察到显著的杀灭作用。在所有的实验中，除非特别说明，该牛尿馏出物浓度被保持在 1 μ l/ml 的水平。

30

实施例 1.在抗生素对革兰氏阴性菌——大肠埃希氏杆菌的杀灭作用中牛尿馏出物所介导的增强作用

表 1:

抗生素	浓度 μ g/ml	在单独用抗生素进行处理时有活力细胞的存活分数	在用抗生素+牛尿馏出物联合进行处理时有活力细胞的存活分数	*抗菌活性的增强倍数
利福平	10	0.86	0.17	5.0
利福平	30	0.05	0.007	7.1
氨苄西林	4	1.11	0.60	1.85
氨苄西林	6	0.09	0.02	4.50
氨苄西林	8	0.05	0.01	5.00

5 *其是通过用抗生素和牛尿馏出物联合进行处理时有活力细胞的存活分数/仅用抗生素进行处理时有活力细胞的存活分数来进行计算的。

实施例 2.在抗生素对革兰氏阳性菌——枯草芽孢杆菌的杀灭作用中牛尿馏出物所介导的增强作用。

10

表 2:

抗生素	浓度 μ g/ml	在单独用抗生素进行处理时有活力细胞的存活分数	在用抗生素+牛尿馏出物联合进行处理时有活力细胞的存活分数	*抗菌活性的增强倍数
利福平	0.005	1.1	0.28	5.5
利福平	0.05	0.03	0.01	3.0
氨苄西林	0.1	1.00	0.3	3.3
氨苄西林	0.5	0.18	0.06	3.0

实施例 3.在抗生素对包皮垢分支杆菌的杀灭作用中牛尿(Go-mutra) 馏出物所介导的增强作用

表 3:

抗生素	浓度 μ g/ml	在单独用抗生素进行处理时有活力细胞的存活分数	在用抗生素+牛尿馏出物联合进行处理时有活力细胞的存活分数	*抗菌活性的增强倍数
利福平	0.05	0.008	0.0001	80
利福平	0.1	0.006	0.0036	1.5
氨苄西林	0.5	0.07	0.006	11.6

从上面的实验可以推测出，当与牛尿馏出物一起使用时，抗生素的效力增强。

5

实施例 4:在异烟肼和过氧化物对大肠埃希氏杆菌的 oxyR 突变体的杀灭作用中牛尿馏出物所介导的增强作用。牛尿馏出物浓度为 0.001 μ l/ml。

表 4:

	浓度	用异烟肼/H ₂ O ₂ 单独进行处理时有活力细胞的存活分数	用异烟肼/H ₂ O ₂ +牛尿馏出物联合进行处理时有活力细胞的存活分数	异烟肼/H ₂ O ₂ 活力的增强倍数
异烟肼	250μg/ml	7.5×10 ⁷	0.99×10 ⁷	7.5
过氧化氢 (H ₂ O ₂)	0.003%v/v	7.14×10 ⁷	1.2×10 ⁷	5.9

10

oxyR 基因是在大肠埃希氏杆菌中诱导过氧化氢-诱导基因的调节子所必需的(Christman M F, Storz G and Ames BN (1989), Oxy R, a positive regulator of hydrogen peroxide inducible genes in Escherichia coli and Salmonella typhimurium, is homologous to a family of bacterial regulatory protein (Proc. Natl. Acad. Sci.(USA).86:3484-3488.)。这些基因的突变体对于药物如异烟肼和过氧化氢而言是敏感的，这些药物能产生自由基，可损害细胞内的系统。所以这些化合物的杀灭活性可以被牛尿增加 5 至 8 倍。

15

20

实施例 5: 在抗癌化合物的活性中牛尿馏出物所介导的增强作用。牛

尿馏出物的浓度为 1 μ l/ml

表 5:

泰素浓度 μ g/ml	有活力细胞的初始 滴度	单独用泰素进行处 理时有活力细胞的 最终滴度	用泰素+牛尿馏出物 进行处理时有活力 细胞的最终滴度
0.001	0.9×10^{-6}	0.059×10^6	0.039×10^6
0.005	0.9×10^{-6}	0.042×10^6	0.032×10^6
0.01	0.9×10^{-6}	0.036×10^6	0.012×10^6

5 在动物细胞培养物中申请人观察到了类似的增强结果(癌细胞系 MCF-7 得自 National Center for Cell Sciences (NCCS), Pune), 在该培养物中抗癌的化学药品‘泰素’的杀灭作用被增强了。在我们的研究中, 牛尿馏出物的组分有助于其它化合物通过膜的转运, 从而可增加其在细菌、动物和植物细胞中的吸收。这又对药物、药剂、营养物和其它的相关化合物和离子的细胞吸收具有很重要的影响。

10

实施例 6:生物活性级分 Gm-IV 对杀真菌剂克霉唑的生物增强作用。该活性级分的浓度被维持在 10 μ g/ml 的水平上。

表 6

处理	最小抑制浓度 (MIC) μ g/ml	增强倍数
克霉唑	4.40	0.0
克霉唑+Gm IV	0.88	5.0

15

在其它的观察中, 该化合物牛尿馏出物增强了抗生素例如利福平、四环素、氨苄西林通过肠以及人造膜的转运。这种在转运中的增强约为 2 至 7 倍。

20

现在将大部分的重点放到保证在印度药品体系中广泛使用的得自可供选择来源的粗制药物的质量上。本发明详细描述了牛尿馏出物在治疗学和营养物应用中的范围和应用。

实施例 7

粉末形式的研制：为了提高牛尿(Go-mutra)的利用度和应用的便利度，申请人进一步进行了分馏以获得没有牛尿馏出物的典型味道的能更容易的被人接受的固体。为此，用如下所描述的方法来对该尿馏出物进行分馏：

5

从牛尿中获得的白色固态结晶的分馏

步骤 1:在一个不锈钢容器中直接从牛无菌地收集牛尿，所述牛是维持在清洁的环境下的。

10

步骤 2:在玻璃蒸馏装置中，在 40-50℃下对十五升牛尿进行连续蒸馏以在 16 至 18 小时内获得 10-12 升馏出物。

步骤 3:将该馏出物包装于对其表面进行了消毒的塑料或玻璃容器中以便于进一步应用。

15

步骤 4:将 200 ml 的牛尿馏出物与一半体积的甲醇进行混合，并用己烷对其进行提取。

20

步骤 5 :将己烷级分(Gm-I)冷冻干燥，并且对与牛尿(Go-mutra)的活性相似的活性进行试验。

步骤 6:将含水级分用乙酸乙酯进行提取，将乙酸乙酯级分(Gm-II)冷冻干燥，并且对与牛尿(Go-mutra)的活性相似的活性进行试验。

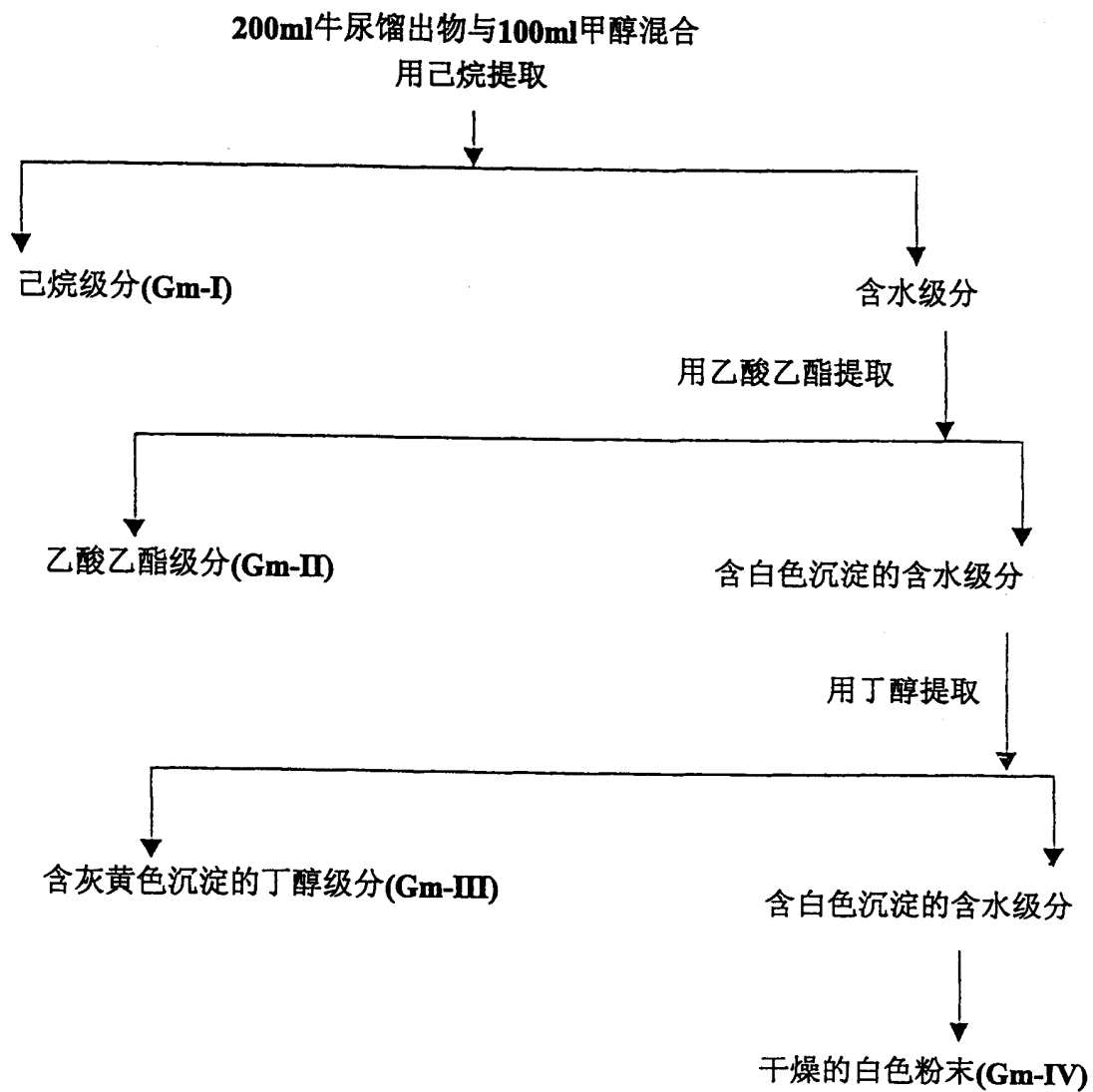
25

步骤 7:此外，将包含白色沉淀的含水级分用丁醇进行提取，将具有灰黄色沉淀的丁醇级分(Gm-III)冷冻干燥，并且对与牛尿(Go-mutra)的活性相似的活性进行试验。

30

步骤 8:将剩余的包含白色晶状沉淀的含水级分进行干燥 (Gm-IV)，并且对与牛尿(Go-mutra)的活性相似的活性进行试验。

流程



每 100 ml 的馏出物可以获得 10 至 20 克的白色粉末(Gm-IV)，其在 0.001 至 10 μ g/ml 的浓度下表现出上面所描述的牛尿馏出物所具有的所有的活性，并且更稳定，而其避免了令人不愉快的味道，因此用作本发明的高级产物。本发明的新颖性还在于通过精确的实验所揭露的事实，即仅仅在字面上表示为毫微至微摩尔水平的浓度范围内才可以获得该增强作用和其效力。并且当在该制剂或组合物中使用更高的浓度/剂量时并不表现出该活性（活性们）。

Gm-IV 级分的物理性质

颜色:白色

物理状态:固体结晶

溶解性:水溶并且混合物包含水

熔点:高于 400°C

比重:1.006

在甲醇:氯仿(50: 50)相中的 RF 值:0.65

牛尿 (Go-mutra) 馏出物的 HPLC 特性

HPLC 是用 LC-8A Shimadzu HPLC，流动相为水:乙腈(80:20)，流速为 1.0 ml/min，在 275 nm 下 UV 检测和 C-18 E MERCK (150 X 4 mm) 柱来进行的。在牛尿(Go-mutra)馏出物的图线（图 1）上观察到了两个主峰(保留时间 5.334 和 11.310 分钟)。

更进一步的特性描述是通过 Feigl's 试验来对该化合物的化学性质进行试验来完成的(参见: E Stahl, 薄层色谱法 (Thin Layer Chromatography)), 其表明了甙或糖的存在。

本发明的新颖性为可以从牛尿(Go-mutra)馏出物中分离出一种稳定的固体级分，其是水溶性的并且可以避免尿的味道，而且可以被直接用于任何制剂中。

Gm-IV 级分也可以增强抗生素和维生素通过哺乳动物肠膜的转运。下面给出了描述了由 Gm-IV 级分来增强利福平的转运的实例。

5 实施例 8: 在穿越生物膜的生物利用度中牛尿(Go-mutra) 馏出物的 Gm-IV 级分所介导的增加(利福平, 1 mg/ml 和 Gm-IV 级分, 1.0 μ g/ml)

表 7:

在供给管中的化合物	波长 (nm)	在如下时间后在接受管中穿越膜的以吸收度形式所测定的 OD (对于化合物最高值是特定的)					
		1 小时	2 小时	3 小时	4 小时	5 小时	6 小时
利福平	A ₃₄₀	0.0097	0.0214	0.0334	0.0771	0.0858	0.0910
	A ₄₇₅	0.0177	0.0284	0.0309	0.0412	0.0484	0.0496
利福平 +Gm-IV	A ₃₄₀	0.0525	0.0961	0.1353	0.1639	0.1919	0.1989
	A ₄₇₅	0.0502	0.0904	0.0793	0.0966	0.1157	0.1183

10 因为牛尿(Go-mutra)馏出物和 Gm-IV 级分都通过增强抗生素通过半透膜和哺乳动物肠膜而表现出了增强的膜渗透性,所以可以假定上述物质可被用于增强分子的肠转运和通过各种生物学功能膜的转运, 其中所说的各种生物学功能膜包括尿/肾系统。

在从 1 至 5 的所有实验中, 发现本发明冻干产物的增强活性具有与该馏出物的增强活性相同的增强活性。

15

本发明可以被进一步的解释如下:

1. 该样品表现出利福平(抗生素)和维生素 B-12 在 2 小时内穿过哺乳动物肠膜(使用山羊肠膜)时的生物利用度的增加并且其在其高至 4 小时的时间内可持续增加。

20

2. 其清楚地表现对避免切开的苹果氧化作用的抗坏血酸作用的抑制, 表明其可能是通过与 INH 的药物作用协同的氧化机理而增强异烟肼(INH)的作用的。

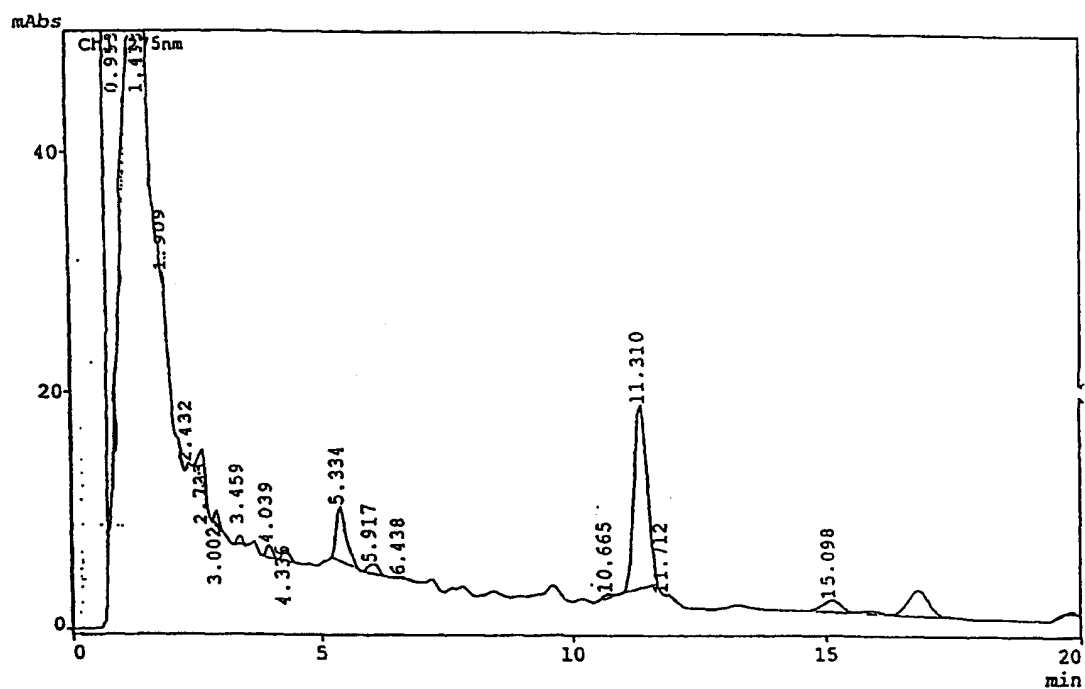
3. 即使在将培养物最终体积稀释 10-50 千倍的情况下, 该馏出物仍然表现了对 INH 的增强作用。

4. 更有趣的是观察到 1 μ l/ml 的馏出物将泰素的活性增强了至少 5 倍。已经优先进行了这方面的进一步实验。

5

样品 :
 ID :
 类型 : 未知
 检测器 : SPD-M10Avp
 控制 :
 方法名称 : ANAL.MET

*** 色谱 ***



*** 峰报告 ***

PKNO	ChNO	TIME	AREA	MK	PURITY.UP	PURITY.DOWN	IDNO	CONC
1	1	0.953	9552712					78.9928
2	1	1.438	2027186					16.7631
3	1	1.909	7380					0.0610
4	1	2.432	2312					0.0191
5	1	2.733	26772					0.2214
6	1	3.002	11050					0.0914
7	1	3.459	5526					0.0457
8	1	4.039	9699					0.0802
9	1	4.336	9040					0.0748
10	1	5.334	59563					0.4925
11	1	5.917	11104					0.0918
12	1	6.438	2800					0.0232
13	1	10.665	4544					0.0376
14	1	11.310	265970					2.1993
15	1	11.712	2676					0.0221
16	1	15.098	94810					0.7840
			12093144					