

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 31/707

A61K 31/727 A61K 38/58

A61P 7/02 G01N 33/68

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01120742.6

[43]公开日 2002 年 6 月 12 日

[11]公开号 CN 1352945A

[22]申请日 2001.5.28 [21]申请号 01120742.6

[30]优先权

[32]2000.11.7 [33]US [31]09/708,306

[71]申请人 先进基因股份有限公司

地址 台湾省台中市工业区七路2-1号

[72]发明人 张素真 徐立伟

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 章鸣玉

权利要求书2页 说明书12页 附图页数12页

[54]发明名称 充作抗血栓形成剂的腺苷

[57]摘要

本发明揭示腺苷与血小板膜受体蛋白质 gpⅡb/Ⅲa 的专一性结合及腺苷 用于抑制血小板凝集及血栓形成的新颖用途。本发明揭示腺苷可用作抗血栓形 成剂。

ISSN 1008-4274

权利要求书

1. 一种用于哺乳动物(包括人类)以抑制血小板凝集的方法, 包括给该哺乳动物(包括人类)体内投用有效量的腺苷。
- 5 2. 一种用于哺乳动物(包括人类)以抑制血栓形成的方法, 包括给该哺乳动物(包括人类)体内投用有效量的腺苷。
3. 一种用于哺乳动物(包括人类)以预防及治疗血栓性栓塞病症的方法, 包括给该哺乳动物(包括人类)体内投用有效量的腺苷。
4. 如权利要求 3 所述的方法, 其中血栓性栓塞病症选自动脉粥样硬化和动脉硬化、急性心肌梗塞、绞痛、短暂性缺血发作和猝死、末梢血管疾病、动脉血栓形成、子痫前期、栓塞或颈动脉内膜切除术。
- 10 5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的方法, 包括给该哺乳动物(包括人类)体内投用有效量的腺苷及抗血栓形成剂。
6. 如权利要求 5 所述的方法, 其中所述抗血栓形成剂选自香豆素、阿司匹林、肝素、LMW 肝素、噻氯匹定、水蛭素、或血栓烷 A₂ 合成酶抑制剂或受体拮抗剂。
- 15 7. 一种体外检测样品中是否存在蛋白质 gpIIb/IIIa 的方法, 系将所述样品与腺苷相对触。
8. 腺苷于哺乳动物(包括人类)体内抑制血小板凝集的用途。
- 20 9. 腺苷充作抗血栓形成剂的用途。
10. 一种用于哺乳动物(包括人类)以抑制血小板凝集的药学组合物, 包含有效量的腺苷及药学上可接受的载体或稀释剂。
11. 一种用于哺乳动物(包括人类)以抑制血栓形成的药学组合物, 包含有效量的腺苷及药学上可接受的载体或稀释剂。
- 25 12. 一种用于哺乳动物(包括人类)以预防及治疗血栓性栓塞病症的药学组合物, 包含有效量的腺苷及药学上可接受的载体或稀释剂。
13. 如权利要求 12 所述的药学组合物, 其中所述血栓性栓塞病症系选自动脉粥样硬化和动脉硬化、急性心肌梗塞、绞痛、短暂性缺血发作和猝死、末梢血管疾病、动脉血栓形成、子痫前期、栓塞或颈动脉内膜切除术。
- 30 14. 如权利要求 10-13 中任一项所述的药学组合物, 其进一步包含抗血栓形成剂。

15. 如权利要求 14 所述的药学组合物，其中所述抗血栓形成剂选自香豆素、阿斯匹林、肝素、LMW 肝素、噻氯匹定、水蛭素、或血栓烷 A₂ 合成酶抑制剂或受体拮抗剂。

5 16. 一种用于哺乳动物(包括人类)以抑制血小板凝集及血栓形成的药盒，包含含有腺苷的第 1 个容器及含有药学上可接受的载体或稀释剂的第 2 个容器。

17. 一种用于哺乳动物(包括人类)以抑制血小板凝集及血栓形成的药盒，包含含有腺苷的第 1 个容器，含有抗血栓形成剂的第 2 个容器，及含有药学上可接受的载体或稀释剂的第 3 个容器。

10 18. 如权利要求 17 所述的药盒，其中所述抗血栓形成剂选自香豆素、阿斯匹林、肝素、LMW 肝素、噻氯匹定、水蛭素、或血栓烷 A₂ 合成酶抑制剂或受体拮抗剂。

说明书

作为抗血栓形成剂的腺苷

5 相关专利申请案

本专利申请案系先前台湾专利申请案 No. 89126484 (1999 年 12 月 12 日申请) 的部份连续申请案。

技术领域

10 本发明关于腺苷充作血小板膜受体蛋白质 gpIIb/IIIa 的拮抗剂以用于抑制血小板凝集及血栓形成的新用途。

发明背景

绝大数血栓性栓塞病症，包括动脉粥样硬化和动脉硬化、急性心肌梗塞、
15 绞痛、短暂性缺血发作和猝发、末梢血管疾病、动脉血栓形成、子痫前期、栓塞及颈动脉内膜切除术，与血管中血块或血栓形成有关。血小板凝集在血栓形成上扮演重要的角色。已发现血小板凝集系取决于纤维蛋白原和其它血清蛋白质与位于血小板浆膜上的血小板膜受体蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合。当血小板经由激动剂(诸如凝血酶)加以活化时，蛋白质 gpIIb/IIIa 结合部位可接受纤维
20 蛋白原和其它血清蛋白质以进行结合，因而产生血小板凝集及血栓形成。因此，抑制纤维蛋白原和其它血清蛋白质与蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合系预防血栓形成的关键。

发展蛋白质 gpIIb/IIIa 拮抗剂以抑制血小板凝集及血栓形成是有希望且人们所期待的解决方式。因此，产业界要求能发展出对蛋白质 gpIIb/IIIa 具
25 专一性的抗血小板凝集剂，其对抗任何一种激动剂，能抑制血小板的活化及凝集。

迄今已使用各种不同产品或化合物以预防血小板凝集及血栓形成，其包括诸如阿斯匹林以拮抗花生四烯酸、噻氯匹定以拮抗二磷酸腺苷(ADP)、水蛭素以拮抗凝血酶、及血栓烷 A₂ 合成酶抑制剂或受体拮抗剂以拮抗血栓烷 A₂ 合成
30 酶。然而，这类产品或化合物并非专一性地抑制纤维蛋白原和其它血清蛋白质与蛋白质 gpIIb/IIIa 之结合，且亦会产生引起持续出血的严重副反应。

USP6, 137, 002、USP6, 020, 362、USP5, 731, 324 及 USP5, 618, 843 揭示某些具有 2 个稠合 6 元环所形成的核的双环化合物，其用作蛋白质 gpIIb/IIIa 拮抗剂以用于抑制血小板凝集。

- USP6, 017, 877 、 USP6, 013, 625 、 USP5, 858, 972 、 USP5, 780, 303 、
5 USP5, 672, 585 及 USP5, 612, 311 揭示某些对蛋白质 gpIIb/IIIa 具有高度专一性之环状肽，其用于抑制血小板凝集，从而用于治疗血栓形成。

USP5, 849, 693 、 USP5, 773, 411 、 USP5, 817, 749 、 USP5, 668, 159 及 USP5, 635, 477 揭示某些由杂环系统所连接的环状化合物，其用作蛋白质 gpIIb/IIIa 拮抗剂以治疗血栓形成。

- 10 USP5, 053, 393 揭示 N-[8-[(氨基亚氨基甲基)氨基]-1-酮基辛基]-N-L- α -天冬酰氨基-L-苯丙氨酸，为用于抑制血小板凝集的有效化合物。

USP4, 879, 313 揭示某些仿真肽之化合物，其系用于抑制血小板凝集及治疗血栓形成。

- USP5, 951, 981 揭示某些由溶纤酶(fibrolase)与特定结合肽经化学交联所
15 形成之轭合物具有溶解血栓的活性。

USP5, 780, 590 揭示充作抗血栓形成剂的化合物 N-[N-[(4-哌啶-4-基)丁酰基]-N-乙基甘氨酸]-(L)-天冬酰氨基]-(L)- β -环己基-丙氨酸酰胺。

USP5, 681, 823 揭示充作抗血栓形成剂的化合物 P¹, P⁴-二硫-P², P³-单氯亚甲基-5', 5''-二腺苷 P¹, P⁴-四磷酸酯。

- 20 本发明之发明人使用高密度栏格技术(high-density gridding technology)从红花(*Carthamus tinctorius* L)萃取流分中筛选出能与蛋白质 gpIIb/IIIa 专一性结合的活性成份，且意外地发现一种小分子化合物，随后经鉴定为腺苷，能强烈地与蛋白质 gpIIb/IIIa 结合，因此能抑制血小板凝集及血栓形成。对照 ADP 为已知化合物且作为活化血小板的内源性激动剂之事实，发现腺苷能抑
25 制血小板的凝集及血栓形成实为非显而易见。据此，本发明揭示腺苷系有效的抗血栓形成剂。

腺苷为已知化合物，用作抗心律不齐剂，同时其衍生物用作抗肿瘤剂。然而，现有技术文献中从未揭示或建议腺苷专一性地与蛋白质 gpIIb/IIIa 结合及治疗血栓性栓塞病症的用途。

- 30 因此，本发明发现腺苷在抑制血小板凝集及血栓形成上的新治疗用途或适应证。

本发明亦涉及腺苷充作蛋白质 gpIIb/IIIa 拮抗剂用于抑制血小板凝集及血栓形成的新用途。

本发明之另一方面系关于一种用于预防及治疗血栓性栓塞病症的方法，系给哺乳动物投用有效量的腺苷，所述血栓性栓塞病症包括诸如动脉粥样硬化和动脉硬化、急性心肌梗塞、绞痛、短暂性缺血发作和猝发、末梢血管疾病、动脉血栓形成、子痫前期、栓塞及颈动脉内膜切除术。

本发明之另一方面系关于一种用于抑制哺乳动物血小板凝集及血栓形成的药学组合物，其包含有效量的腺苷及药学上可接受的载体或稀释剂。

本发明之另一方面系关于一种用于抑制哺乳动物的血小板凝集及血栓形成的药盒，其包含含有腺苷的第 1 个容器及含有药学上可接受的载体或稀释剂的第 2 个容器。

25

本发明之发明人发现使用高密度栏格技术 (high-density gridding technology) 可从红花 (*Carthamus tinctorius* L) 的萃取流分中得到一种能与蛋白质 gpIIb/IIIa 专一性结合的活性成份, 随后该活性成份经鉴定为腺苷。因此, 腺苷可用于抑制血小板凝集及血栓形成。

高密度栏格技术，已被用于定性或定量地检测生物样品中是否存在标的物。高密度栏格技术系于固体载体已划有栏格的表面上，固定相当多列小体积或微小体积的样品。通过高密度栏格技术，将可能含有标的物的生物样品配置或固定于固体载体上，加入能与该标的物杂交或吻合的标记探针至该固体载体上并进一步处理，显影及分析该经杂交或吻合的固体载体，随后可迅速地筛选出能与该标记探针专一性反应的标的物候选者。

本发明利用 HPLC 以分级红花的萃取物。将各个流分配置于塑料盘上。将经标记的血小板膜受体蛋白质 gpIIb/IIIa(一种涉及血小板凝集及血栓形成的重要作用因子)加入至该塑料盘上以进行结合反应。随后除去未结合的蛋白质 gpIIb/IIIa。筛选出显示与该标记蛋白质 gpIIb/IIIa 结合之讯号的候选流分，并重复上述之步骤直到获得能与该标记蛋白质 gpIIb/IIIa 结合的单一成份。该能与蛋白质 gpIIb/IIIa 专一性结合的单一成份经鉴定为腺苷。

腺苷为已知的化合物，用作抗心律不齐剂，同时其衍生物系用作抗肿瘤剂。然而，先前技艺文献中从未揭示或建议腺苷专一性与蛋白质 gpIIb/IIIa 结合及治疗血栓性栓塞病症的用途。于是，本发明揭示腺苷可充作抗血栓形成剂以治疗血栓性栓塞病症。

血栓性栓塞病症包括，例如，动脉粥样硬化和动脉硬化、急性心肌梗塞、绞痛、短暂性缺血发作和猝发、末梢血管疾病、动脉血栓形成、子痫前期、栓塞或颈动脉内膜切除术。

本发明提供一种用于抑制血小板凝集及血栓形成的方法，系给哺乳动物(包括人类)投用有效量的腺苷。

本发明亦提供一种用于预防及治疗血栓性栓塞病症的方法，系给哺乳动物(包括人类)投用有效量腺苷。

本发明提供一种用于抑制哺乳动物(包括人类)的血小板凝集及血栓形成的药学组合物，其包含有效量的腺苷及药学上可接受的载体或稀释剂。

本发明亦提供一种用于预防及治疗哺乳动物(包括人类)的血栓性栓塞病症的药学组合物，其包含有效量的腺苷及药学上可接受之载体或稀释剂。

进一步，本发明提供一种用于抑制哺乳动物(包括人类)的血小板凝集及血栓形成的药盒，包括含有腺苷的第 1 个容器及含有药学上可接受的载体或稀释剂的第 2 个容器。

更进一步，本发明提供一种活体外检测样品中是否存在蛋白质 gpIIb/IIIa

的方法，系令该样品与腺苷相接触。

本发明的药学组合物可经口服或静脉内注射(i. v.)方式给药。本发明的药学组合物的适当剂型包括例如药片、胶囊、药丸、粉末、颗粒、溶液、酏剂、酹剂、糖浆、悬浮液、乳液及类似型式。

- 5 本发明的药学组合物的剂量可加以改变，系取决于投药途径，患者的年龄、健康和生理状态及体重，症状性质和范围，以及所欲达成之功效。通常，腺苷的每日口服投药剂量为约 15 至 150mg/kg 患者体重，每日静脉内注射剂量为约 1.5 至 15mg/kg 患者体重。

- 10 本发明的药学组合物可与其它已知的抗血栓形成剂合用以达到治疗上的协同增效效应。已知的抗血栓形成剂包括例如香豆素、阿斯匹林、肝素、LMW 肝素、噻氯匹定、水蛭素、及血栓烷 A_2 合成酶抑制剂或受体拮抗剂。

依据动物(鼠)模型所得到的数据显示，本发明的药学组合物对患者并未造成任何急性毒性现象，其中经静脉内注射给予患者达约 70mg/kg 患者体重的单剂腺苷。

- 15 本发明将通过下述实施例作进一步阐释和说明；但是，须注意的是本发明的范围并不以下述实施例为限。

实施例 1

- 20 用常规掺合法，利用甲醇(40ml)萃取 5g 红花(*Carthamus tinctorius* L; 购自联合中西药局，台中市，台湾)。浓缩萃取液至最终体积为 8ml。将浓缩之萃取液(100 μ l)注入 ODS-凝胶 OSD80 T M (4.6mm $\times$ 25cm, TOSO, 日本)管柱中，进行 HPLC(Shimadzu 10-AT, 日本)分析。起初用水洗脱该浓缩的萃取液达 5 分钟，随后用乙醇-水洗脱液(于 105 分钟内乙醇浓度自 0%(v/v)线性增加至 70%(v/v))进行洗脱。于随后 5 分钟洗脱中，洗脱液中乙醇浓度增加至 25 100%(v/v)。于 254nm 波长下检测洗脱出的样品，以每份 0.5ml 进行样品收集。其洗脱概图示于图 1A。

- 为进行标的物结合分析，从血小板纯化血小板膜受体蛋白质 gpIIb/IIIa，经 SDS-PAGE 和银染色法测定其纯度。依据惯用之方法和步骤，利用生物素(biotin)标记经纯化的蛋白质 gpIIb/IIIa。将所收集的 120 个样品各别地涂覆至含有 384 个孔的塑料盘上。将经生物素标记的蛋白质 gpIIb/IIIa 加入至该 30 经样品涂覆的塑料盘上，于室温下培育该塑料盘达 30 分钟。利用 TBS T 缓冲

液 3 次，对每一个孔加入抗生物素蛋白质(avidin)外轭合的碱性磷酸酶，进一步培育 30 分钟。重复上述步骤，并对每一个孔加入磷酸对硝基苯酯底物以进行呈色反应。对每一个孔，用自动化 ELISA 读数计(Dynax)于 405nm 波长下，进行吸光度测定。图 1B 显示对应于图 1A 所示样品的 OD_{405nm} 测量值，表示每一个孔的内容物与蛋白质 gpIIb/IIIa 结合的能力。

实施例 2

收集并集中图 1A 所示第 25 至 40 流分，如实施例 1 所述方法，将所得的集中流分注入至管柱中，用 HPLC 进行分析。上述乙醇-水洗脱过程改为 20 分钟，且乙醇浓度从 20%线性增加至 30%。其流程概图示于图 2A。

利用实施例 1 所描述的方法，进行标的蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合分析。每一个流分对蛋白质 gpIIb/IIIa 结合能力的结果示于图 2B。

实施例 3

收集并集中图 2A 所示第 5 和 6 流分，随后进行第 3 次 HPLC 分析，其中用一定成份的洗脱液(9%乙醇和 91%水)洗脱 20 分钟。结果得到滞留时间为 10.7 分钟的单一成份(波峰)，显示出最强的结合活性(参阅图 3 所示洗脱概图)。

将按图 3 洗脱概图所收集的化合物干燥，并用电喷雾离子化质谱(electrospray ionization mass spectrum)测定其分子量(MW)。如图 4A 所示，测定主要波峰值为 $268.04m/z$ (标准误差为 ± 0.11)。同时，亦测定差值为约 $21.9m/z$ 的另一波峰值 $289.9m/z$ ，其被认为系主要波峰化合物的钠盐。再者，亦测定出许多相关多重电荷之波峰值(535.6, 802.1, 1069.7, 1357.9, 1604.4 及 $1871.1m/z$; 参阅图 4B)。多重电荷喷雾法通常用于测定生物性聚合物，图 4B 所示多个波峰明确地分别对应于主要波峰化合物的二聚物至七聚物。对于每一个多重电荷波峰值，邻近处(差值为约 $22m/z$)所出现的波峰讯号被认为其对应的轭合钠盐。由上述结果可知，该经分离的化合物的分子量为 $268gm/摩尔$ ，且具有形成聚合物的能力。

实施例 4

鉴定得自于图 3 概图且于实施例 3 中加以干燥的化合物。测定其熔点为 $230-232^{\circ}C$ 。该化合物的元素分析为 44.94%C、4.90%H、26.21%N 及 23.95%O。

利用质谱测定该化合物的分子量为 267.24gm/mole。由初步数据计算该化合物的分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_4$ 。

利用 1-D¹H 和 ¹³CNMR, 2-¹H-¹H 相关性, ¹H-检测 ¹³C-¹H, 及 ¹⁵N-¹H 相关性 NMR 技术以分析该化合物的结构。利用 Varian 600MHz NMR 光谱收集数据。1-D¹HNMR 和 2-D¹H-¹HCOSY 和 T OCSY 光谱建立质子连接态样, 其显示该化合物含有 1 个 β-呋喃核糖残基, 3 个可交换之质子(源自 OH 基), 及 1 个嘌呤环系统。片段态样之整合结果与元素分析所得之质子数目一致。¹³CNMR 分析数据证实该化合物中所存在的碳原子数。利用 ¹H-检测 ¹³C-¹HNMR 以测定碳原子与氢原子的连接状态及该氢原子的位置。该测定结果与嘌呤和核糖环系统一致。¹⁵N-¹H 相关性 NMR 分析数据显示该化合物所含有的 4 个氮原子之态样系与嘌呤环系统所显现者一致。此结果亦与元素分析所显现者一致。最后利用 1-D¹HNMR 对腺苷进行分析, 发现腺苷与该化合物所呈现的光谱图本质上无法区别。该 NMR 分析数据系如下表所示:

表一 ¹H, ¹³C 及 ¹⁵N 化学位移(相对于 TMS 之 ¹H=0.000ppm; 相对于 DMSO 之 ¹³C=39.80ppm; 及 ¹⁵N 适当)及 ¹H-¹H 耦合常数(>1.0Hz; 括号), 针对推定的腺苷异构物及图 3 概图所得化合物, DMSO-d₆ 及 308° K

	^1H	$(J_{i,j})$	^{13}C	^{15}N
N-1	—			~184
H/C-2	8.164		152.56	
N-3	—			~173
C-4	—		149.39	
C-5	—		119.57	
C-6	—		156.30	
N-7	—			~190
H/C-8	8.354		140.18	
N-9	—		203.58	~118
H ₂ N-6	7.301			ND
H/C-1'	5.910	$(^3J_{1,2}=6.3)$	88.18	
H/C-2'	4.631	$(^3J_{2,3}=4.9)$	73.64	
H/C-3'	4.174	$(^3J_{3,4}=3.4)$	70.81	
H/C-4'	3.994	$(^3J_{4,5a}=3.6)$	86.08	
H/C-5a'	3.574	$(^3J_{4,5b}=3.4)$	61.83	
H/C-5b'	3.690	$(^3J_{5a,5b}=-12.2)$		
HO-2'	5.418			
HO-3'	5.153			
HO-5'	5.381			

该化合物之 UV 最大吸光度系与腺苷所显现者相同。该化合物之 IR 光谱亦与腺苷所显现者相同。

- 5 利用 2 个不同管柱(Synergi Polar-RP 和 Synergi Max-RP), 2 个不同流速及数种移动相, 且用腺苷作为主要标准物以进行 HPLC 分析, 其结果显示该化合物之纯度为 95.05%(因为样品中存有水)。该化合物与腺苷的 HPLC 分析的滞留时间相同。

基于上述分析, 该化合物被认证为腺苷。

实施例 5

实施例 4 所得到的化合物(腺苷)用作界定每批制备化合物的标准物。收集并干燥经纯化之该化合物, 验证其与蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合能力。为进行结合分析, 将该化合物配制为水溶液, 并对其进行系列稀释以生成最终浓度为 0 至 50 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液。每一个测试溶液含有不同的化合物量, 将其滴加到 96 孔塑料盘的平面孔上。随后对每一个测试孔加入经标记的蛋白质 gpIIb/IIIa, 并以如实施例 1 所述的方法进行呈色反应。其结合曲线示于图 5, 当该化合物浓度低于 10 $\mu\text{g/ml}$ 时, 结合现象显著地增加, 可达至最大结合量的 80%。

10 实施例 6

为分析该化合物抑制血小板凝集的活性, 用常规的经 ADP 活化的血小板凝集分析。进行该分析所用的反应试剂系购自 Sigma。图 6A 显示该化合物在抑制血小板凝集上的剂量反应关系。当该化合物的浓度为 10 至 15 $\mu\text{g/ml}$ 血液时, 其最大抑制活性为约 85%。利用该化合物(浓度为 17.4 $\mu\text{g/ml}$)测定抑制血小板凝集的活性与时间关系, 其结果示于图 6B, 其中于第 14 至 16 分钟的时间间隔中, 最大抑制活性为约 85%。

实施例 7

利用鼠之肠系膜静脉的活体内血栓形成模型以评估该化合物抑制静脉血栓形成的效应。详言之, 每一个剂量测试系使用多组实验鼠(每组 3 只, Wistar 雄鼠, 每只鼠重 $60 \pm 10\text{gm}$)。用苯巴比妥钠(50mg/kg, 腹腔注射)麻醉, 并用氯琥珀胆碱 2ng/鼠, 腹腔注射)麻痹鼠只。随后暴露出肠系膜环和静脉, 并将其置放于建构平台上。于 37°C 下, 除了置入电极及进行刺激时, 用生理盐水浸没所暴露之肠系膜环和静脉。利用解剖显微镜和显微手术, 置入单极钨电极并令其与该静脉接触。藉由 Glass S-44 刺激器所提供的单一方形波电脉冲(1000PPS, 100V, 300ms), 引起静脉血栓形成。随后利用显微镜校正接目镜观察血栓的形成。相对静脉闭塞(测定血栓形成的程度)系以静脉直径(0.36 至 0.38mm)的百分比计, 于 10 秒(基础对照值)和每一分钟间隔(持续 20 分钟)进行记录。进行肠系膜静脉电流刺激前 5 分钟, 静脉注射该化合物或安慰剂。对于安慰剂治疗组, 以平均 20 分钟间隔记录值, 达到静脉直径范围的 45 至 55%。随后, 计算该化合物的抗血栓活性, 以相对于安慰剂处理的对照组的抑制%表

示。若观察到 3 只鼠显示显著抑制作用(>30%)，则利用线性回归对该 3 只鼠每一剂量单位测定其 $ED_{30} \pm SEM$ 值。对每一个时间点，利用双侧 Student's t 测验进行统计分析，以比较安慰剂对照组和测试化合物组(显著性水平 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

5 图 7A 显示于诱发电流刺激后，在第 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 及 19 分钟的时间点，该化合物(400 μ g/鼠)具有比安慰剂处理组显著的抗血栓活性。该化合物(20, 50, 100, 200 及 400 μ g/鼠)抗血栓活性的剂量反应关系示于图 7B。

10 为评估口服给予该化合物后的抗血栓活性，采用如上所述的动物实验模型，唯以口服给药(电流刺激前 1 小时)代替静脉注射，给药剂量为 4mg/鼠。实验结果示于图 7C，在第 14, 15, 16, 17, 18 及 20 分钟之时间点，观察到相对于安慰剂处理组显著的抗血栓活性。

实施例 8

15 利用竞争型 ELISA 分析以比较测试化合物抑制纤维蛋白原与蛋白质 gpIIb/IIIa 结合的能力，使用实施例 4 的化合物，购得之腺苷(Sigma 的产品，目录号码 A-9251，批号 18H0295)及 ReoPro®(abciximab)(10mg/ml; Eli Lilly 之产品，仅供实验室使用；批号 97 F 03；其系为单株抗体及蛋白质 gpIIb/IIIa 之拮抗剂)作为测试化合物。将从血小板所纯化的蛋白质 gpIIb/IIIa 涂覆于 96
20 孔塑料盘的平底孔上。制备每一个测试化合物之样品(浓度为 5 至 60 μ g/ml)，和生物素标记的纤维蛋白原的溶液(浓度为 1.5 μ g/ml)。将每一个测试化合物的样品分别与等体积生物素标记纤维蛋白原混合，再加入孔中。于 37°C 下，在孔中进行竞争性结合反应达 2 小时。再经 2 小时培育后，对每一个孔加入经链生物素耦合的碱性磷酸酶。用常规方法，将含有磷酸对硝基苯酯底物的溶液加入至每一个孔槽中以进行呈色反应。测定每一个测试化合物抑制纤维蛋白原与蛋白质 gpIIb/IIIa 结合之能力并以 OD 值加以记录。其结果如图 8 所示，其中
25 实施例 4 的化合物与购得的腺苷在抑制纤维蛋白原与蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合上具有相似的作用，且实施例 4 的化合物比 ReoPro®(abciximab)在抑制纤维蛋白原与蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合上具有较优的作用。

30

实施例 9

静脉内注射给予单次剂量，检测实施例 4 的化合物在成鼠体内的潜在急性毒性。将 20 只成鼠分为 5 个处理组(每组皆有 2 只雄性成鼠及 2 只雌性成鼠)：组 1：对照组；组 2：1mg 化合物/kg 鼠只体重；组 3：10mg 化合物/kg 鼠只体重；组 4：50mg 化合物/kg 鼠只体重；及，组 5：100mg 化合物/kg 鼠只体重。用 0.9%NaCl 注射液配制测试化合物以形成 $0.64 \pm 0.05\text{mg/kg}$ (组 2)， $6.89 \pm 1.13\text{mg/kg}$ (组 3)； $35.02 \pm 5.02\text{mg/kg}$ (组 4)及 $69.55 \pm 5.65\text{mg/kg}$ (组 5)。将测试物于第 1 天经静脉内注射至鼠只体内，并于第 8 天排定进行解剖以大体检视器官和组织，测量器官重量，且收集组织以进行潜在的组织病理检测。观察后发现化合物处理组中皆未有可归因于该化合物所造成的临床征状，血清化学，血液学，大体检视，体重及器官重量(绝对 2 相对上)上的改变。结果，化合物处理组中未观察到明显的毒性现象。

附图的简单说明

图 1A 显示红花(*Carthamus tinctorius* L)萃取物于 120 分钟内的 HPLC 洗脱概图。

图 1B 显示由波长 405nm 下的吸旋光性检测得到图 1A 的洗脱样品对蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合概图。

图 2A 为按图 1A 所示第 25 至 40 流分所收集的样品组于 20 分钟内的 HPLC 洗脱概图。

图 2B 显示由波长 405nm 下的吸旋光性检测得到图 2A 所示洗脱样品对蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合概图。

图 3 为按图 2A 所示第 5 和 6 流分所收集的样品组于 15 分钟内的 HPLC 洗脱概图，其中存有单一波峰，其滞留时间为 10.7 分钟，且显示对蛋白质 gpIIb/IIIa 具有最强的结合活性。

图 4A 显示经由电喷雾离子化质谱(electrospray ionization mass spetcctrum)检测，从图 3 概图所得到的化合物的分子量为 268gm/摩尔。

图 4B 显示图 3 概图所得到的化合物存在钠盐和寡聚物(二聚物至七聚物)的型式。

图 5 显示实施例 4 所得到的化合物与蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合曲线，其中当该化合物浓度系低于 $10 \mu\text{g/ml}$ 时，结合显著地增加，可达到最大结合量

的 80%。

图 6A 显示实施例 4 所得到的化合物在抑制血小板凝集上的剂量反应关系，其中当化合物的浓度为 10 至 15 $\mu\text{g/ml}$ 血液时，其最大抑制活性约为 85%。

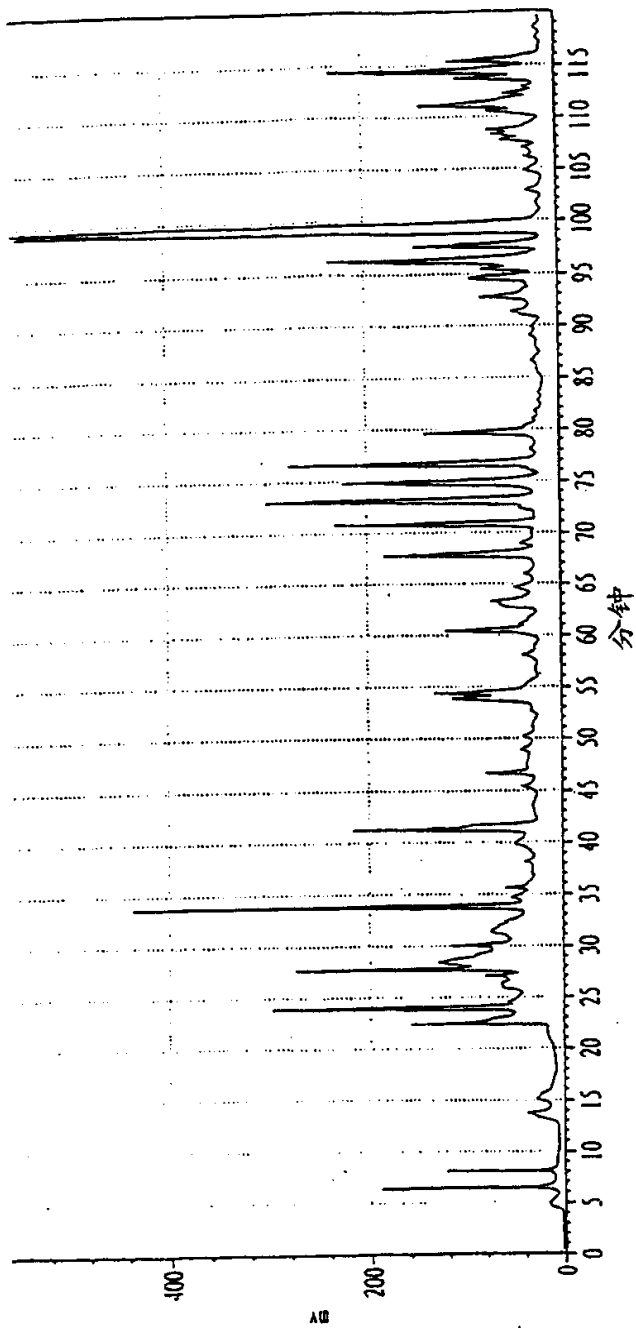
图 6B 显示当实施例 4 所得到的化合物的浓度为 17.4 $\mu\text{g/ml}$ 时对血小板凝集 5 的抑制活性与时间的关系，在第 14 至 16 分钟之间，产生的抑制活性约为最大抑制活性的 85%。

图 7A 显示经由投用实施例 4 所得到的化合物(400 $\mu\text{g}/100\text{ }\mu\text{l}$ /鼠)后，体内抑制鼠肠系膜静脉的血栓形成与时间的关系。

图 7B 显示静脉内注射实施例 4 所得到的化合物于体内抑制鼠肠系膜静脉 10 血栓形成的剂量反应关系。

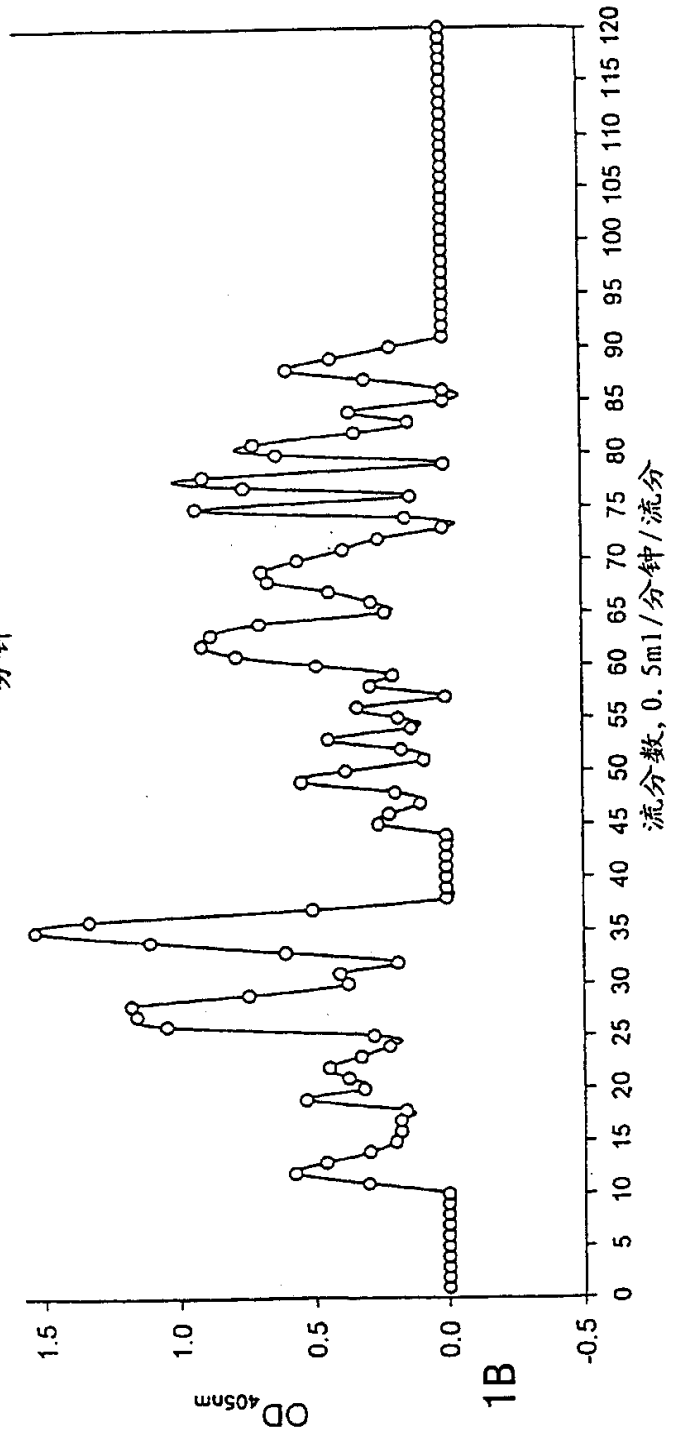
图 7C 显示经口服给予实施例 4 所得到的化合物后，体内抑制鼠肠系膜静脉血栓形成与时间的关系。

图 8 显示 ELISA 分析的比较性结果，其中分别使用实施例 4 所得到的化合物，购得的腺苷及 ReoPro®(abciximab)以进行抑制纤维蛋白原与蛋白质 15 gpIIb/IIIa 的结合。



1A

图



1B

图

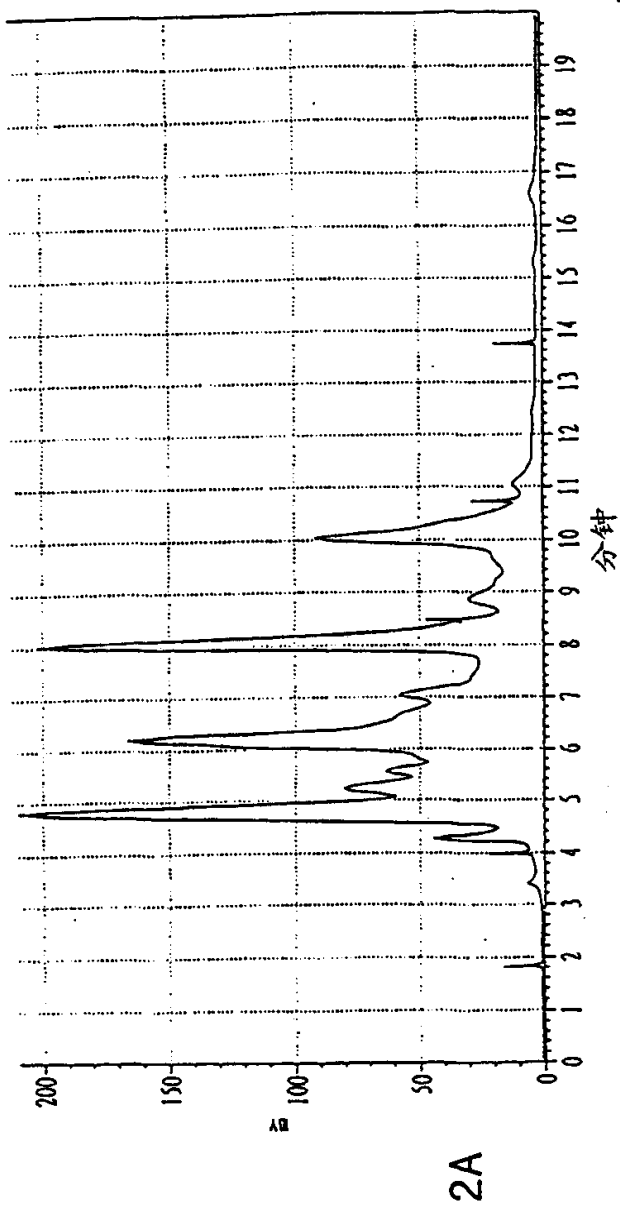


图 2A

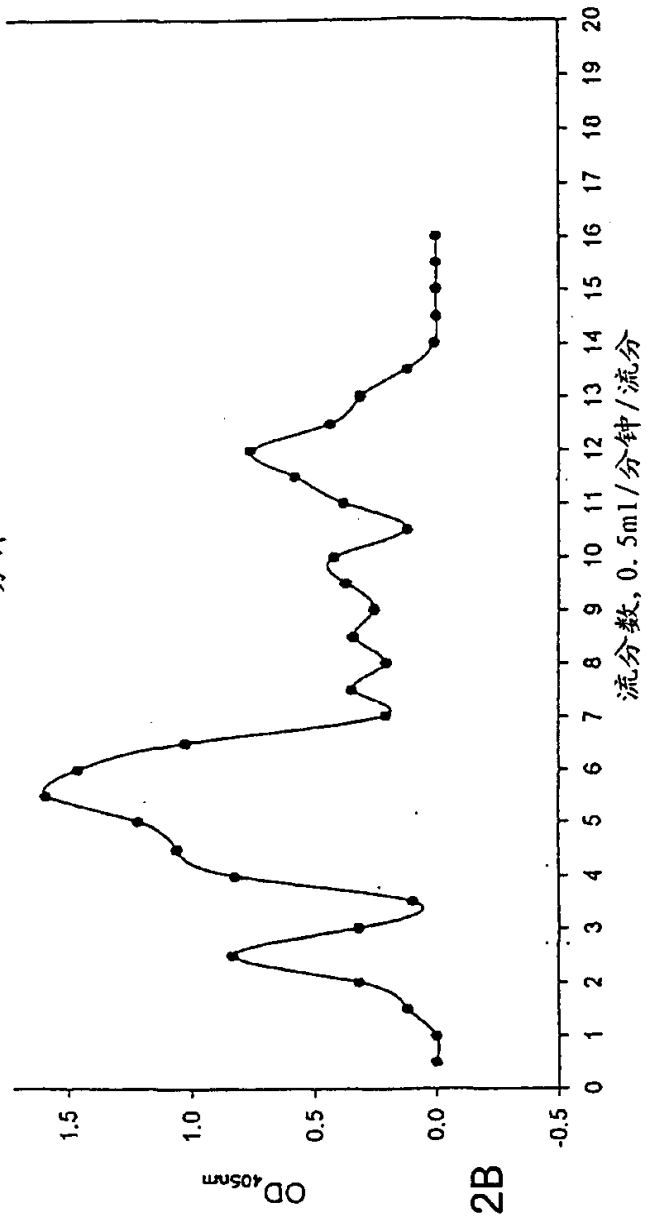


图 2B

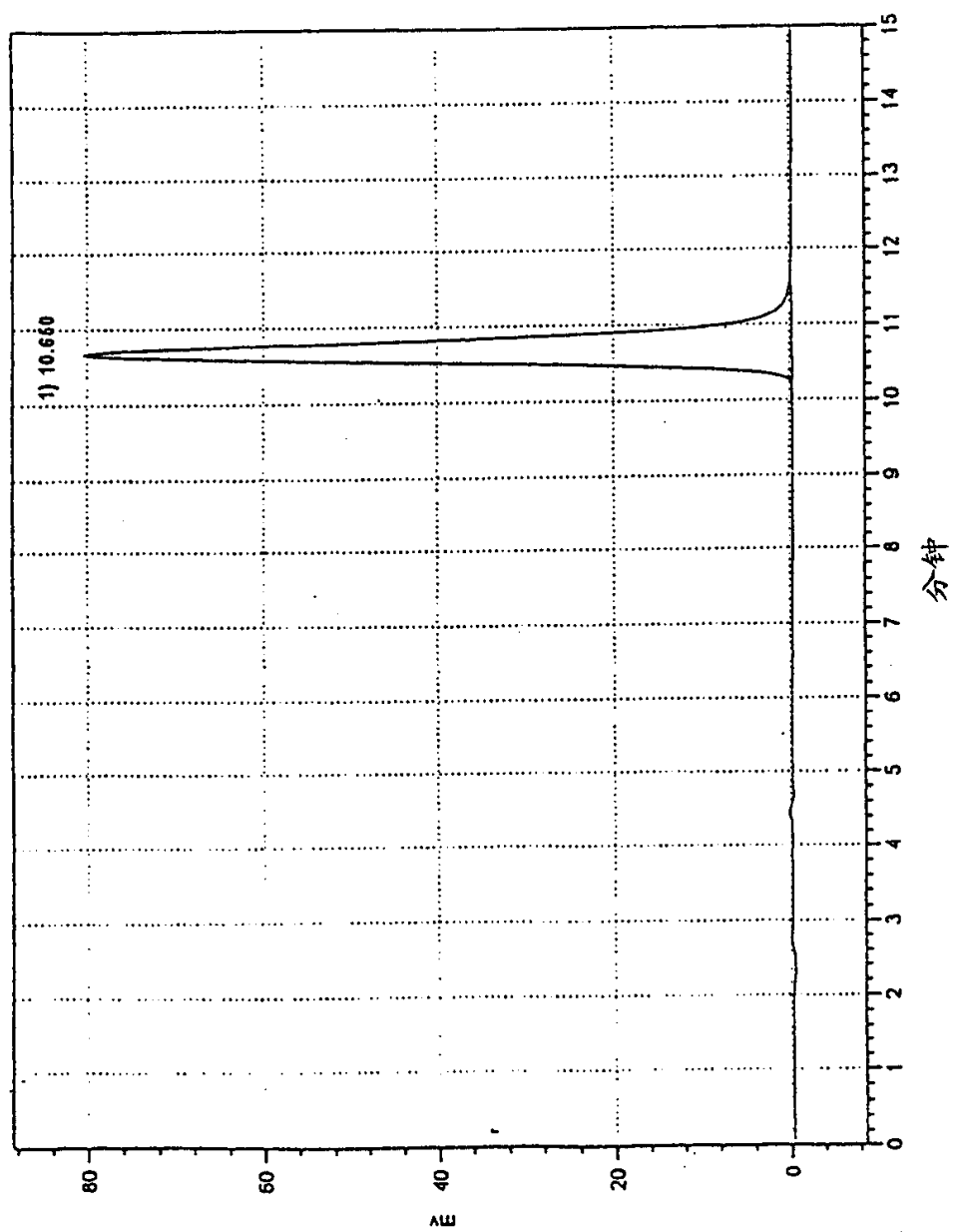
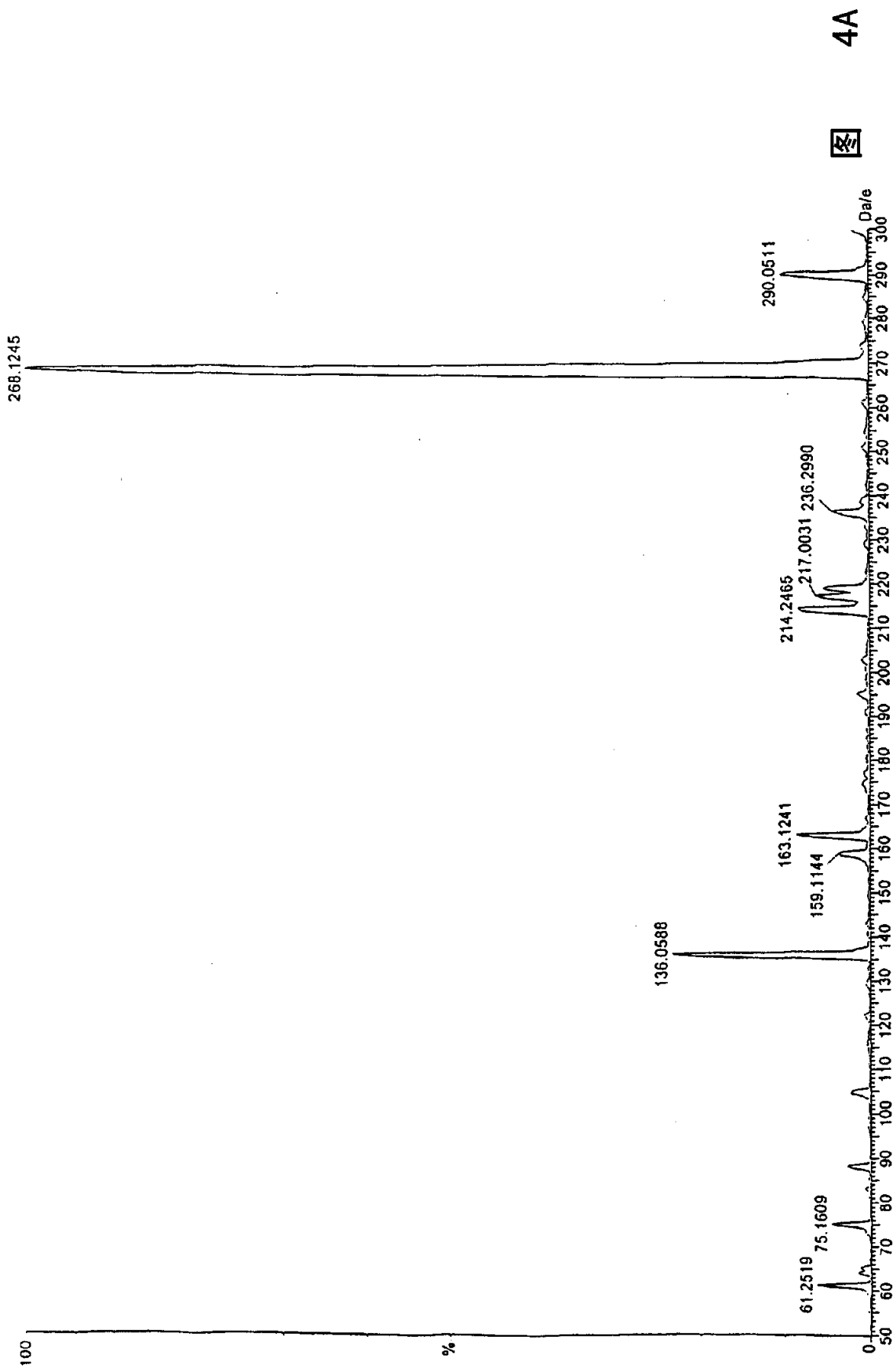
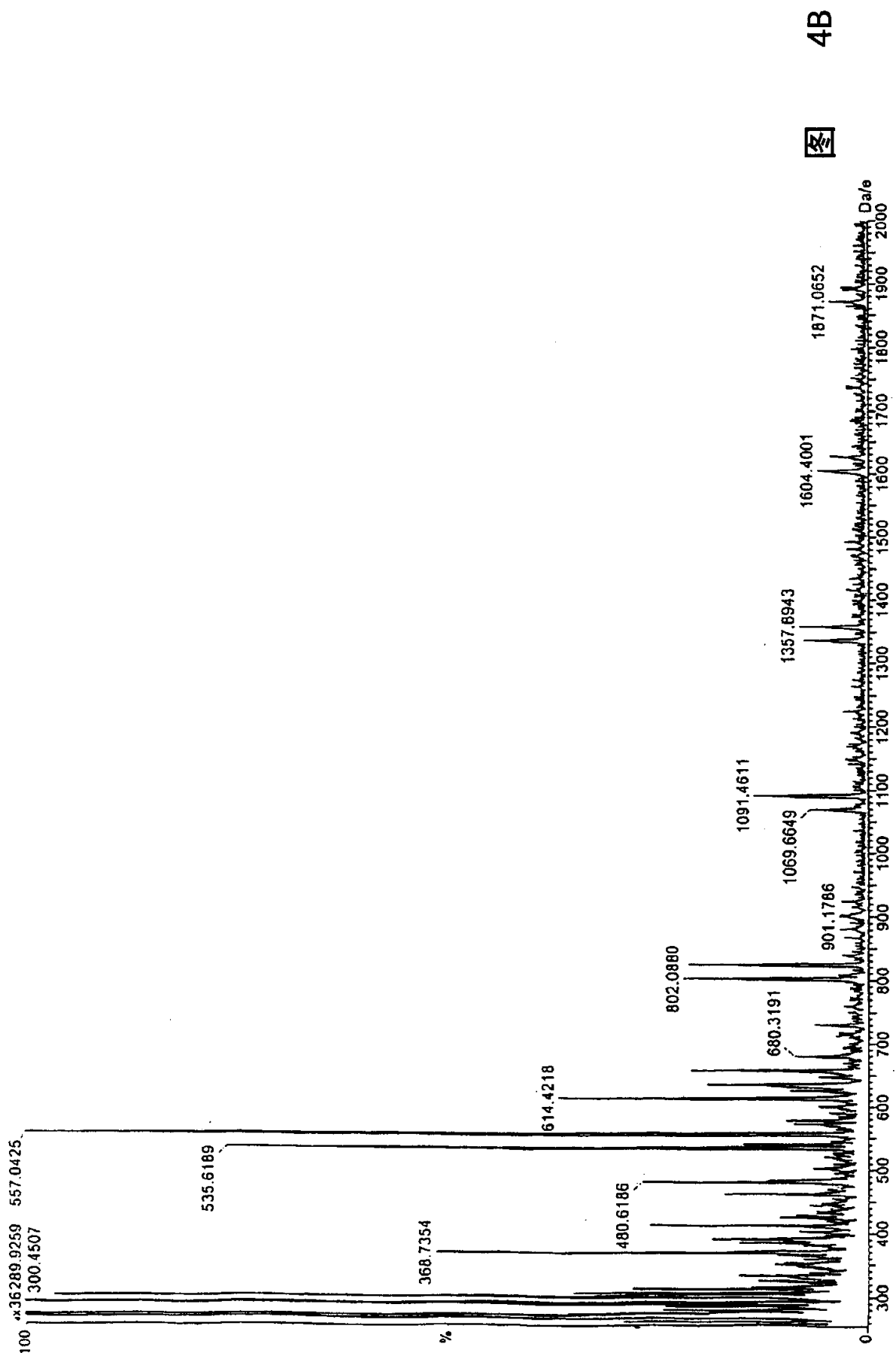


图 3

0000



000000



图

4B

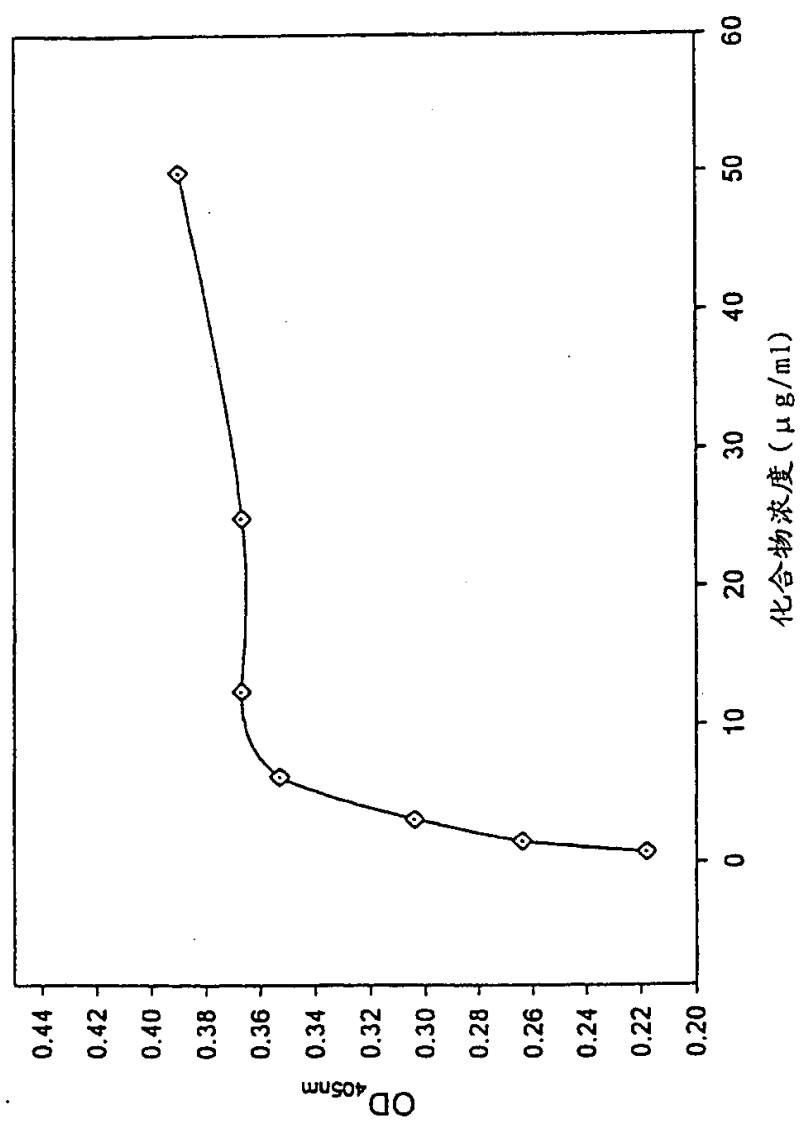


图 5

血小板聚集的抑制活性

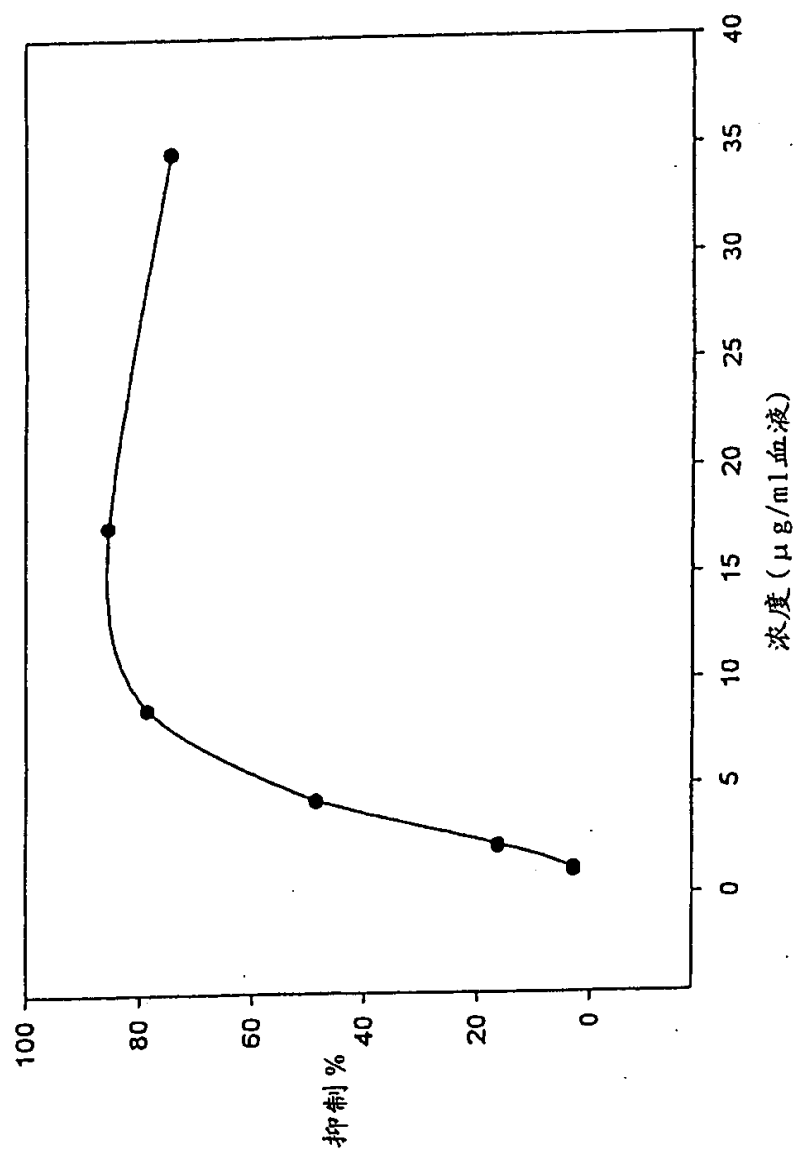


图 6A

抑制血小板聚集的活性与时间的关系

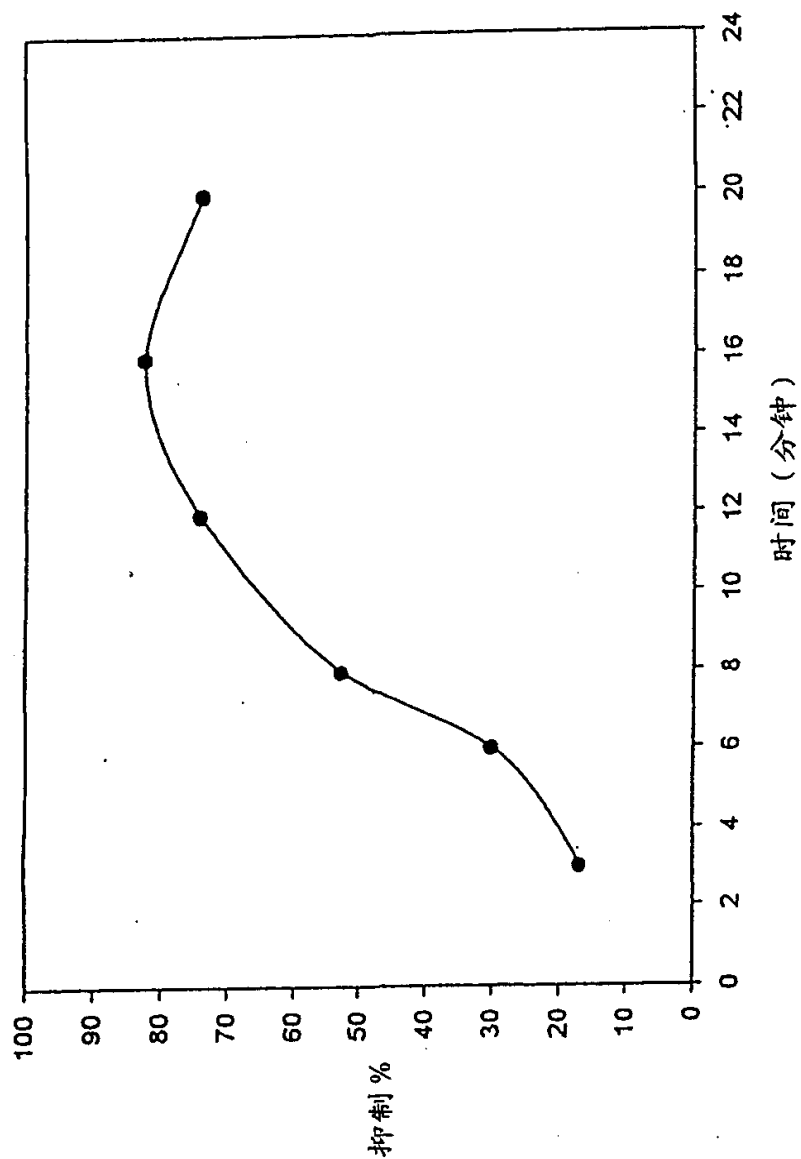


图 6B

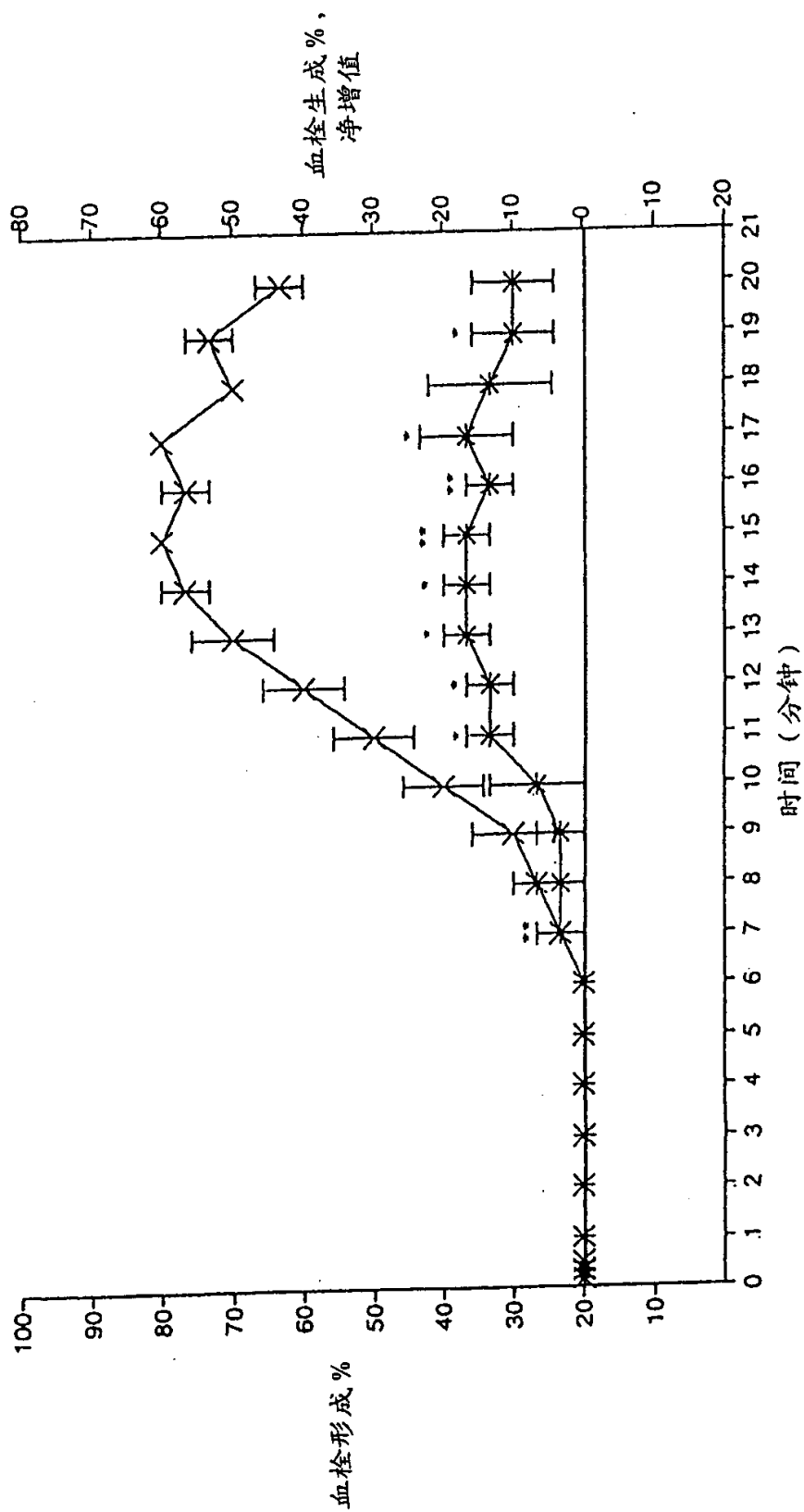


图 7A

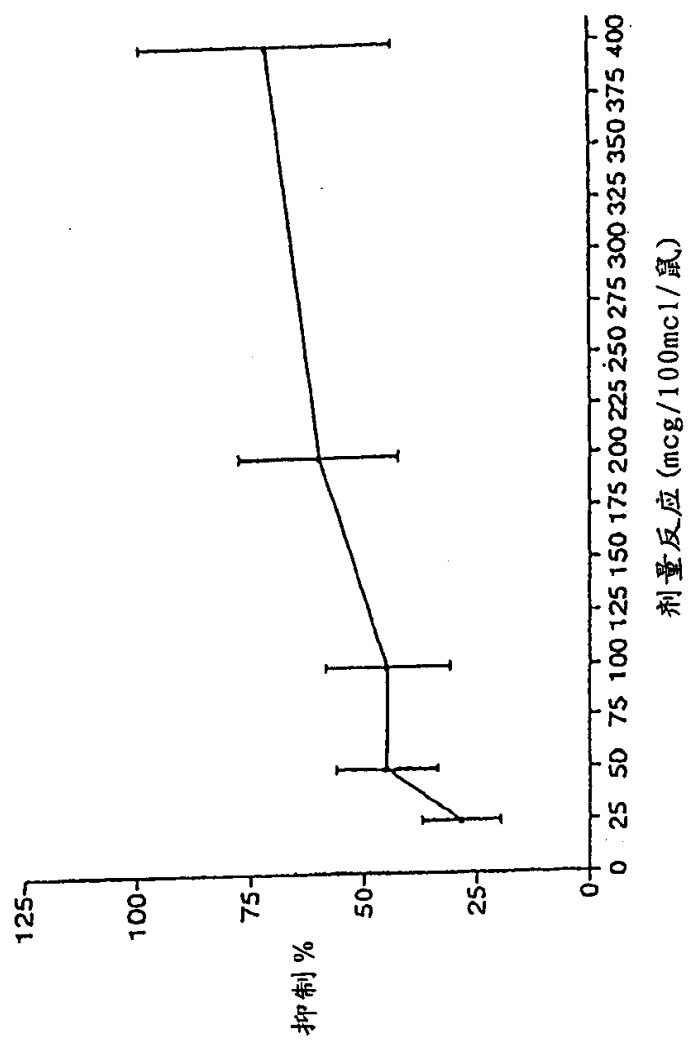


图 7B

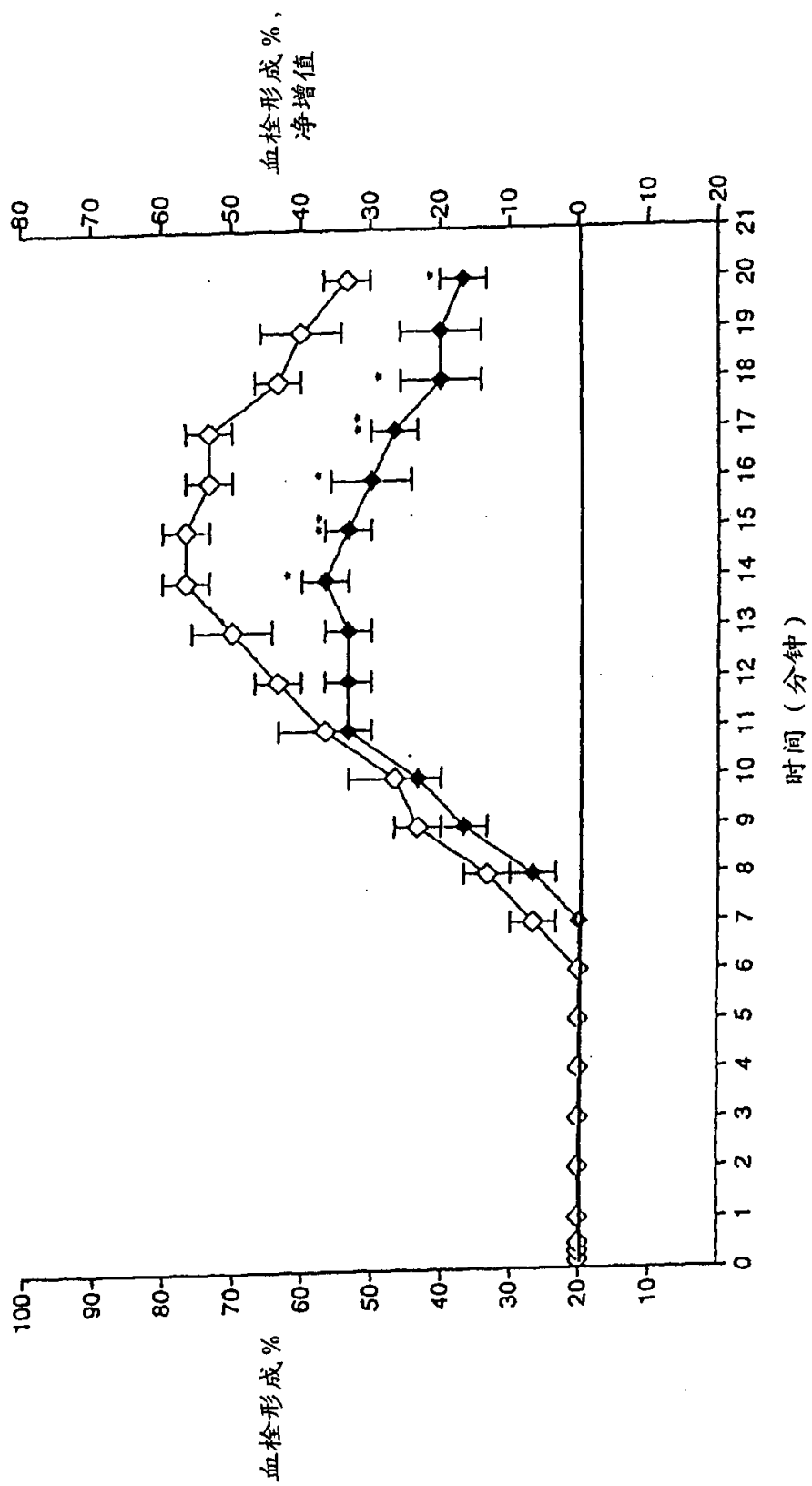


图 7C

抑制纤维蛋白原与蛋白质gp IIb/IIIa的结合

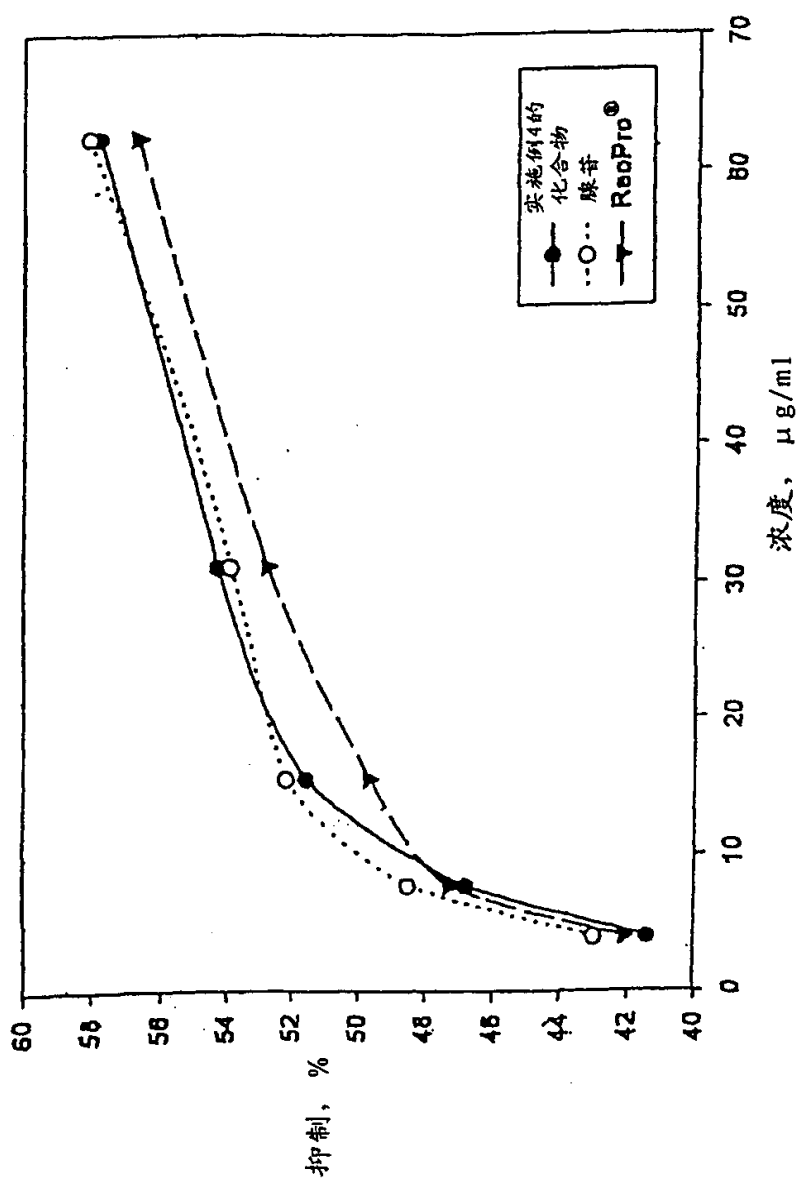


图 8