

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/68

B01D 11/02

A61K 35/78



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01132691.3

[45] 授权公告日 2005 年 9 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1220060C

[22] 申请日 2001.9.4 [21] 申请号 01132691.3

[30] 优先权

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

[71] 专利权人 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

审查员 万雪松

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

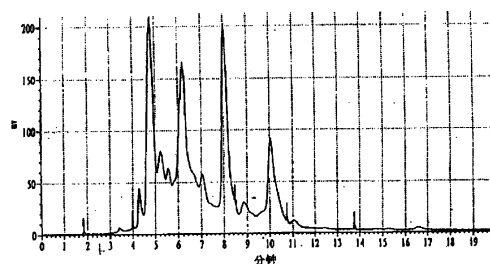
代理人 任永武

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 11 页

[54] 发明名称 自植物萃取物中筛选活性成份的方法及组套

[57] 摘要

本发明揭示一种自植物的萃取物中筛选出生物活性成份的方法，所述方法包含将植物的粗萃取物的分级成份配置于格状固体载体上，对所述载体加入充作探针的经标记的标的物且适当地培育所述载体，随后检测所预期的信号并回收对应于所述信号的具有生物活性的成份。借助本发明的方法，可自红花 (*Carthamus tinctorius* L) 的萃取物得到经纯化且具有生物活性的小分子化合物，所述化合物能专一地与血小板膜受体蛋白质 gpIIb/IIIa 结合。



ISSN 1008-4274

1. 一种自植物萃取物中筛选出具有抑制血小板聚集或抗血栓形成的活性成份的方法，所述方法包含：将植物的粗萃取物分级配置于固体载体上，对所述载体加入能够与所述粗萃取物中具有抑制血小板聚集或抗血栓形成的活性成份结合的标记血小板膜受体蛋白质 gpIIb/IIIa，及随后检测并回收所述的活性成份。

2. 如权利要求 1 的方法，其特征在于，所述植物是草本植物。

3. 如权利要求 2 的方法，其特征在于，所述草本植物是红花。

4. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法，其特征在于，所述生物活性成份之一是分子量为 268 的小分子。

5. 如权利要求 4 的方法，其特征在于，所述小分子是可自行聚合的。

6. 一种用于权利要求 1 的方法的自植物的萃取物中筛选出具有抑制血小板聚集或抗血栓形成的活性成份的组套，所述组套包含：固体载体和格状配置于所述固体载体上的所述植物萃取物的分级液、用于探针杂交的标记血小板膜受体蛋白质 gpIIb/IIIa、及用于冲洗、信号检测及回收所述活性成份的试剂。

7. 如权利要求 6 所述的组套，其特征在于，所述植物是草本植物。

8. 如权利要求 7 所述的组套，其特征在于，所述草本植物是红花。

自植物萃取物中筛选活性成份的方法及组套

技术领域

本发明有关应用高密度栏格技术以自植物的萃取分级物中筛选出所需的生物活性成份。

背景技术

植物，特别是草本植物，是对动物具有药理或治疗功效的生物活性成份的天然来源。许多药物或其前驱物是分离获自植物。通常，借助利用惯用的技术(如萃取、沉淀、离心及复杂的层析技术)以自植物或其萃取物中分离经纯化的生物活性成份需耗费大量的人力和时间。迄今，并没有一种简单的方法能快速地从自植物或其萃取物中筛选出所需的生物活性成份。

近来，高密度栏格技术(high-density gridding technology)已被用于定性或定量地检测于生物样品中是否存有标的物。所述高密度栏格技术是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。借助所述高密度栏格技术对可能含有标的物的生物样品是配置或固定于固体载体上，将能与所述标的物杂交或共轭的标记探针加入至所述固体载体上并进一步处理，显影及分析所述经杂交或共轭的固体载体，进而可迅速地筛选出能与所述标记探针进行专一性反应/作用的标的物候选者。

然而，迄今借助高密度栏格技术于固体载体上能成功地被检测的标的物仅限于数种大分子标的物，诸如核酸片断/序列或肽或蛋白质。例如，USP 6, 004, 755 揭示一种用于杂交分析的方法，该方法包含于杂交条件下令稳定地载于固体载体表面上的一系列探针分子与经终端标记的标的核酸样品接触以产生杂交型态。USP 6, 040, 138 揭示一种使核酸样品杂交至高密度排列的低核苷酸探针类上的方法，其中所述高密度排列的低核苷酸探针类是与所述核酸样品中标的核酸的亚序列互补。USP 6, 087, 103 揭示一种借助配位体结合以筛选标的物的方法，该方法包含利用结合至固体载体上经标记的蛋白质配位体。先前技术 WO99/38013 揭示一种利用特定组合标的物筛选固定于载体上的蛋白质的方法，及新疆工学院学报，第 18 卷，第 4 期，第 270-272 页揭示一种自草本植物红花萃取红花的方法。先前技术或现有的技术皆未教导或建

议借助利用所述高密度栏格技术可成功地筛选出具有生物活性的小分子标的物。

因此，有需要发展出一种简单且快速的方法，该方法能大量地自植物或其萃取物中筛选出具有生物活性的小分子成份。此外，为符合筛选时技术上的要求，亦有需要发展出一种简单的组套，它能用于自植物或其萃取物中筛选出具有生物活性的小分子成份。

发明内容

本发明的目的是提供一种自植物的萃取物中筛选出具有抑制血小板聚集或抗血栓形成的活性成份的方法，可简单且快速大量地自植物或其萃取物中筛选出具有所述生物活性的小分子成份。

根据本发明一方面提供一种自植物萃取物中筛选出具有抑制血小板聚集或抗血栓形成的活性成份的方法，所述方法包含：将植物的粗萃取物分级配置于固体载体上，对所述载体加入能够与所述粗萃取物中具有抑制血小板聚集或抗血栓形成的活性成份结合的标记血小板膜受体蛋白质 gpIIb/IIIa，及随后检测并回收所述的活性成份。

根据本发明另一方面提供一种用于本发明上述方法自植物的萃取物中筛选出具有抑制血小板聚集或抗血栓形成的活性成份的组套，所述组套包含：固体载体和格状配置于所述固体载体上的所述植物萃取物的分级液、用于探针杂交的标记血小板膜受体蛋白质 gpIIb/IIIa、及用于冲洗、信号检测及回收所述活性成份的试剂。

为更清楚理解本发明的目的、特点和优点，下面将通过结合附图的较佳实施例进一步具体说明本发明。

附图说明

图 1A 是说明红花 (*Carthamus tinctorius* L) 的萃取物于 120 分钟内的 H P L C 流洗轮廓图；

图 1B 是说明借助于波长 405 n m 下的吸旋光性检测图 1A 的流洗样品对蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合轮廓图；

图 2A 是说明图 1A 所示的第 25 至 40 分级液所收集的样品组于 20 分钟内的 H P L C 流洗轮廓图；

图 2B 是说明借助于波长 405 n m 下的吸旋光性检测图 2A 所示的流洗样品对蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合轮廓图；

图 3 是说明图 2A 所示的第 5 和 6 分级液所收集的样品组于 15 分钟内的 HPLC 流洗轮廓图，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 是说明经由电喷雾质谱(electrospray mass spetctrum)检测图 3 的轮廓图所得到的化合物的分子量为 268 的曲线图；

图 4B 是说明图 3 的轮廓图所得到的化合物存有钠盐和寡聚物(2 聚物至 7 聚物)的型式曲线图；

图 5 是说明图 3 的轮廓图所得到的化合物与蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合曲线，其中当所述化合物的浓度低于 $10\mu\text{g/ml}$ 时，所述结合是显著地增加且可达至最大结合量的 80%；

图 6A 是说明图 3 的轮廓图所得到的化合物于抑制血小板聚集上的剂量反应的曲线图，其中当所述化合物的浓度是 10 至 $15\mu\text{g/ml}$ 血液时，最大抑制活性约为 85%；

图 6B 是说明当图 3 的轮廓图所得到的化合物的浓度是 $17.4\mu\text{g/ml}$ 时，对血小板聚集的抑制活性与时间的关系曲线图，其中于第 14 至 16 分钟的时间间隔中，产生的抑制活性约为最大抑制活性的 85%；

图 7A 是说明经由投服图 3 的轮廓图所得到的化合物($400\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ /鼠)后，活体内抑制鼠的肠系膜静脉的血栓形成与时间的关系。

图 7B 说明静脉内注射图 3 的轮廓图所得到的化合物于活体内抑制鼠的肠系膜静脉的血栓形成的剂量反应。

图 7C 说明经由口服给予图 3 的轮廓图所得到的化合物(4mg /鼠)后，活体内抑制鼠的肠系膜静脉的血栓形成与时间的关系图。

具体实施方式

本发明提供一种自植物的萃取物中迅速地筛选出生物活性成份的方法。所述方法包含分级植物的粗萃取物，令每一个分级液成份配置于固体载体上，将充作探针的标记标的物加入至所述固体载体上，培育所述固体载体以使存在于所述粗萃取物中所需的生物活性成份与所加入的探针进行专一性结合，及随后检测并筛选出所需的生物活性成份。

已知植物，特别是草本植物，是从事新药物开发的天然来源。然而，借助惯用的技术以自植物分离得到纯化型式的生物活性成份需耗费大量的人力和时间。

高密度栏格技术(high-density gridding technology)已被用于检测样品中

所需的标的物，它涉及于固体载体的栏格表面上固定小量体积或微量体积的多列样品。所述高密度栏格技术的优点是在于能同时进行数百个或更多如于个别试管中不同的实验。借助所述高密度栏格技术，将被怀疑含有所需的标的物的样品固定于固体载体上，加入能与所述标的物杂交或共轭的标记探针至所述固体载体上，处理、显影并分析经杂交或共轭的固体载体，且随后可迅速地检测出能与所述标记探针进行专一性反应/作用的标记物候选者。于实际应用上，所述高密度栏格技术已被用于诊断、药物筛选、开发治疗性标的物及决定药理机转等的领域。

然而，迄今借助所述高密度栏格技术能成功地检测出的标的物仅限于数种大分子标的物，诸如核酸片段或蛋白质。先前技术或现有的技术皆未教示或建议借助所述高密度栏格技术可成功地检测并筛选出具有所需的生物活性的小分子标的物。

本发明揭示借助所述高密度栏格技术，可自植物的萃取物中成功地检测并分离出纯化型式的具有生物活性的小分子标的物。依据本发明的方法，利用层析法令植物的粗萃取物分级，并令个别的分级物成份固定于具有栏格的固体载体的表面上，随后加入经标记的标的物至所述固体载体上以进行杂交，检测所述固体载体上含有能与所述标记标的物反应/作用的具有生物活性的小分子化合物的位置，且随后回收、分离并最终纯化所述具有生物活性的小分子化合物。

于本发明的较佳实施例中，起初借助利用H P L C以分级草本植物的萃取物。令个别的分级液配置于具栏格的固体载体的表面上。将经标记的蛋白质加入至所述固体载体的表面上以进行杂交反应。随后除去未结合的蛋白质。筛选出显示与所述标记的蛋白质结合的信号的考生分级液，并重复上述的步骤直到获致能与所述标记的蛋白质结合/作用的单一成份。

于本发明的特定较佳实施例中，起初借助利用H P L C以分级红花(*Carthamus tinctorius* L)的萃取物。令个别的分级液配置于塑料盘上。将经标记的血小板膜受体蛋白质 gpIIb/IIIa(一个重要的作用因子，它能于活体外抑制血小板的聚集及于活体内抑制血栓的形成)加入至所述塑料盘上以进行结合反应。随后除去未结合的蛋白质 gpIIb/IIIa。筛选出显示与所述标记的蛋白质 gpIIb/IIIa 结合的信号的考生分级液，并重复上述的步骤直到获致能与所述标记的蛋白质 gpIIb/IIIa 结合/作用的单一成份。

若能使用取样，高密度排列样品及检测的整合自动化装置，则能更有效率地实施本发明的方法。

本发明的方法具有下述技术上的优点及功效上的改良：(1)当将样品配置于固体载体的表面上时，用于筛选的样品体积量可小至微升(microliter)或微微升(picoliter)级的量，(2)检测出存有能直接地与标记的标的物反应/作用的所需的小分子化合物，则明确地证实所述小分子化合物能与经标记的标的物进行专一性结合，且所筛选出的小分子化合物可能具有预期的药理功能/作用，(3)配置有植物萃取物的分级液的固体载体可用于充作所述特定植物的萃取物分级片(chip)，例如草本植物的萃取物分级片(herbal chip)，它是可广泛地作为筛选所需的生物活性成份的平台(platform)，及(4)实施所述筛选方法是借助利用小面积高配置样品密度的固体载体以取代使用大量的试管以进行个别的实验/反应。

本发明将借助下述的实施例以进行进一步的阐释和说明；但是，须注意的是本发明的范围并不以下述的实施例为限。

实施例

实施例 1:

借助惯用的掺合法，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。将浓缩的萃取液(100 μ l)注入 O D S - 凝胶 O S D 80 T M (4.6 mm \times 25 cm, T O S O H, 日本)管柱中以进行 H P L C (Shimadzu 10-AT, 日本)分析。起初利用水以流洗所述浓缩的萃取液达 5 分钟，随后利用乙醇-水流洗液于 105 分钟内乙醇浓度自 0% (v/v) 线性增加至 70% (v/v) 进行流洗。于随后的 5 分钟流洗中，流洗液的乙醇浓度增加至 100% (v/v)。于 254 nm 波长下检测流洗出的样品且以每 0.5ml 样品进行样品的收集。其流洗轮廓图显示于 1A。

为进行标的物结合分析，自血小板纯化血小板膜受体蛋白质 gpIIb/IIIa，并借助 S D S - P A G E 和银染色法测定其纯度。依据惯用的方法和步骤，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 384 个孔槽的塑料盘上。将经生物素标记的蛋白质 gpIIb/IIIa 加入至所述经样品涂覆的塑料盘上，并于室温下培育所述塑料盘达 30 分钟。利用 T B S T 缓冲液冲洗每一个孔槽 3 次，对每一个孔槽加入抗生物素蛋白质(avidin)外共轭的碱性磷酸酯酶，并且每一个孔槽是进一步进行培育达 30 分钟。重复上述的冲洗步骤，并对每一个孔槽加入对一硝基苯基磷酸酯基质以进行呈色反应。对每一个孔槽，借助利用自动化 E L I S A 读数计(Dynax)于 405 nm 波长下，进行吸光度的测定。图 1B 显示对应于图 1A 所示的样品的 O D_{405 nm} 测量值，其说明每一个孔槽的

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 所示的第 25 至 40 分级液，并如实施例 1 所描述的方法那样，将所得的集中分级液注入至管柱中，并借助利用 HPLC 进行分析。上述的乙醇-水流洗过程改为 20 分钟，并且乙醇浓度是自 20% 线性增加至 30%。其流程轮廓示于图 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。对每一个分级液，其对蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合能力的结果示于图 2B。

实施例 3

收集并集中图 2A 所示的第 5 和 6 分级液，随后进行第 3 次 HPLC 分析，其中利用一定成份的流洗液(9%乙醇和 91%水)进行流洗 20 分钟。结果得到滞留时间为 10.7 分钟的单一成份(波峰)，其显示出最强的结合活性(参阅图 3 所示的流洗轮廓图)。

干燥自图 3 的轮廓图所收集的化合物，并借助利用电喷雾质谱(electrospray mass spectrum)测定其分子量(MW)。如图 4A 所示，测定主要波峰值为 268.04 m/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 289.9 m/z，它被认为是主要波峰的化合物的钠盐。另外，亦测定出许多相关多重电荷的波峰值(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是用于测定生物性聚合物，且图 4B 所示的多个波峰是明确地分别对应于主要波峰的化合物的 2 聚物至 7 聚物。对于每一个多重电荷波峰值，邻近处(差值为约 22m/z)所出现的波峰信号被认为是其对应的共轭钠盐。经由上述的结果可知，所述经分离的化合物的分子量是 268 g m/莫耳，且其具有形成聚合物的能力。

实施例 4

图 3 所示的轮廓图是用于充作界定每批制备的化合物的特性标准。进一步，收集并干燥经纯化的化合物，且验证其与蛋白质 gpIIb/IIIa 的结合能力。为进行结合分析，制备所述经纯化的化合物的水溶液，并对其进行一系列的稀释以生成最终浓度为 0 至 50 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液。每一种测试溶液含有不同的化合物量，并将其滴点至 96 孔槽塑料盘的平面孔槽上。随后对每一个测试孔槽加入经标记的蛋白

质 gpIIb/IIIa, 并以如上所述的方法进行呈色反应。其结合曲线是示于图 5, 其中当所述化合物的浓度低于 $10\mu\text{g/ml}$ 时, 结合现象是显著地增加且可达至最大结合量的 80%。

实施例 5

为分析所述化合物抑制血小板聚集的活性, 使用惯用的活化 ADP 血小板聚集分析。进行所述分析所用的反应试剂是购自 Sigma。图 6A 显示所述化合物于抑制血小板聚集上的剂量反应。当所述化合物的浓度是 10 至 $15\mu\text{g/ml}$ 血液时, 其最大抑制活性是为约 85%。借助利用所述化合物(浓度为 $17.4\mu\text{g/ml}$)以测定其抑制血小板聚集的活性与时间的关系, 其结果是示于图 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 6

利用鼠的肠系膜静脉的活体内血栓生成模式以评估上述的化合物于抑制静脉血栓生成上的功效。具体说, 每一个剂量测试是使用多组实验鼠(每组 3 只衍生自 Wistar 的雄鼠, 每只鼠重 $60\pm 10\text{mg}$)。利用苯巴比妥钠(phenobarbital sodium; 50mg/kg , 腹膜内注射)麻醉鼠只, 并利用氯化琥珀酰胆碱(succinylcholine chloride; 2ng/鼠 , 腹膜内注射)麻痹鼠只。随后暴露出肠系膜环和静脉, 并将其针藏于建构平台上。于 37°C 下, 除了置入电极及进行刺激时, 利用一般的盐水浸没所暴露的肠系膜环和静脉。借助利用解剖显微镜和显微手术, 置入单极钽电极并令其与所述静脉接触。借助 Glass S-44 刺激器所提供的单一方形波电冲击(1000 P P S , 100 V , 300 m s), 起始所述静脉血栓的生成。随后利用显微镜校正接目镜观察血栓的生成。相对静脉闭塞(测定血栓生成的程度)是以静脉直径(0.36 至 0.38mm)的百分比加以测定, 且于 10 秒(基础对照值)和每一分钟间隔(持续 20 分钟)进行记录。于进行肠系膜静脉的电流刺激前 5 分钟, 静脉注射测试化合物或安慰剂。对于安慰剂治疗组, 平均 20 个间隔记录值是达到所述静脉直径范围的 45 至 55%。进而, 测试化合物的抗血栓活性是以相对于安慰剂治疗的对照组的抑制%计算表示。若观察到 3 只鼠所显示的显著抑制功效($>30\%$), 则利用线性回归对所述 3 只鼠每一剂量单位测定其 $\text{E D}_{30}\pm\text{S E M}$ 值。对每一个时间点, 利用一对 Student's *t* 测定以进行统计分析以比较安慰剂对照组和测试化合物组(显著水准 $* P < 0.05$, $** P < 0.01$)。

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，相对于安慰剂治疗组，测试化合物(400 μ g/ml 鼠)具有显著的抗血栓活性。测试化合物(20，50，100，200 及 400 μ g/ml 鼠)于抗血栓活性上的剂量反应是示于图 7B。

为评估口服给予所述测试化合物后的抗血栓活性，进行类似于上述的动物实验模式，唯其静脉注射是以口服给药(电流刺激前 1 小时)取代，其中给药剂量是 4mg/鼠。其实验结果是示于图 7C，其中相对于安慰剂治疗组在第 14，15，16，17，18 及 20 分钟的时间点，观察到显著的抗血栓活性。

图 1A

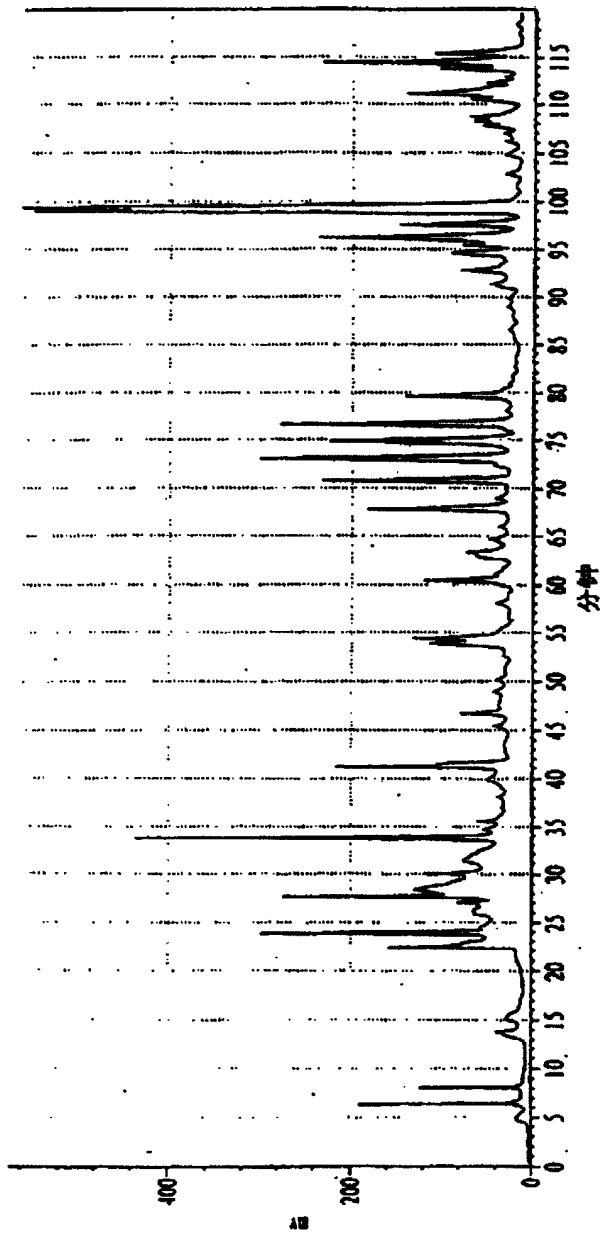
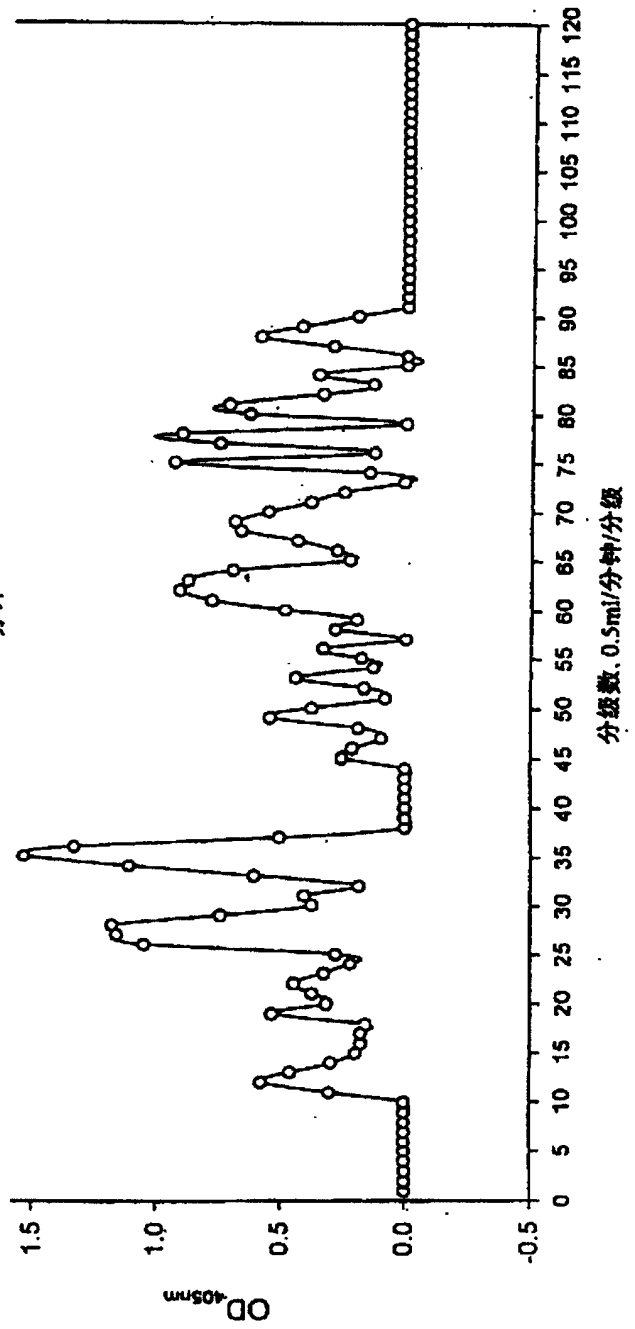
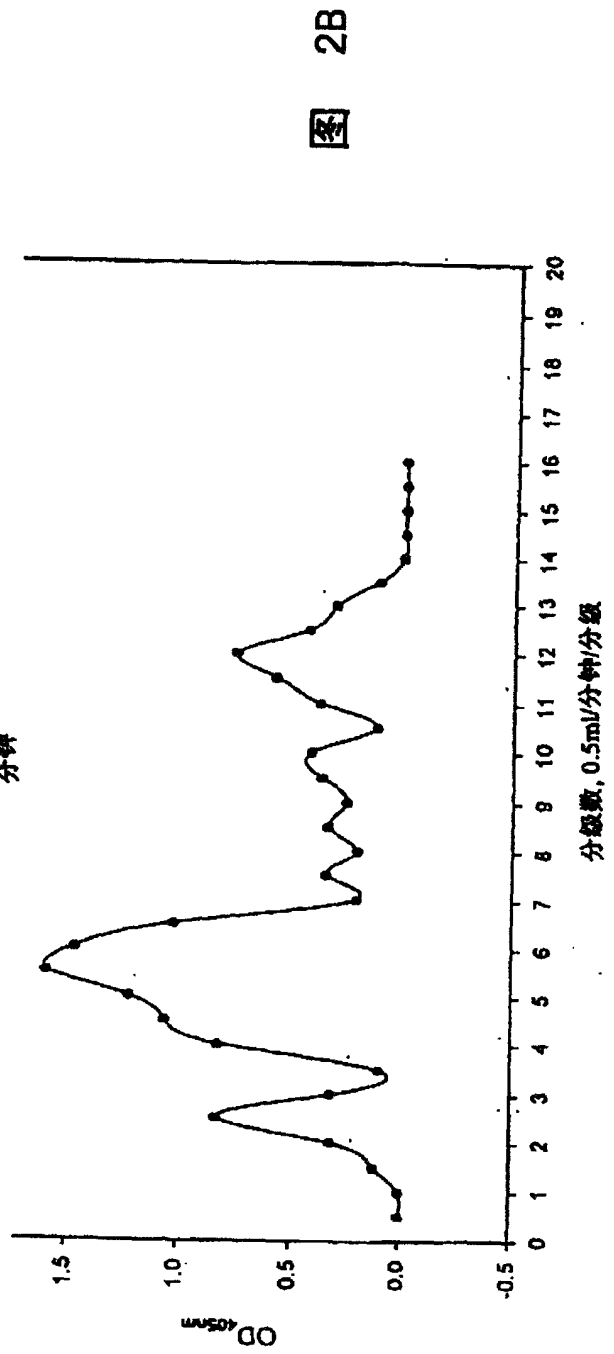
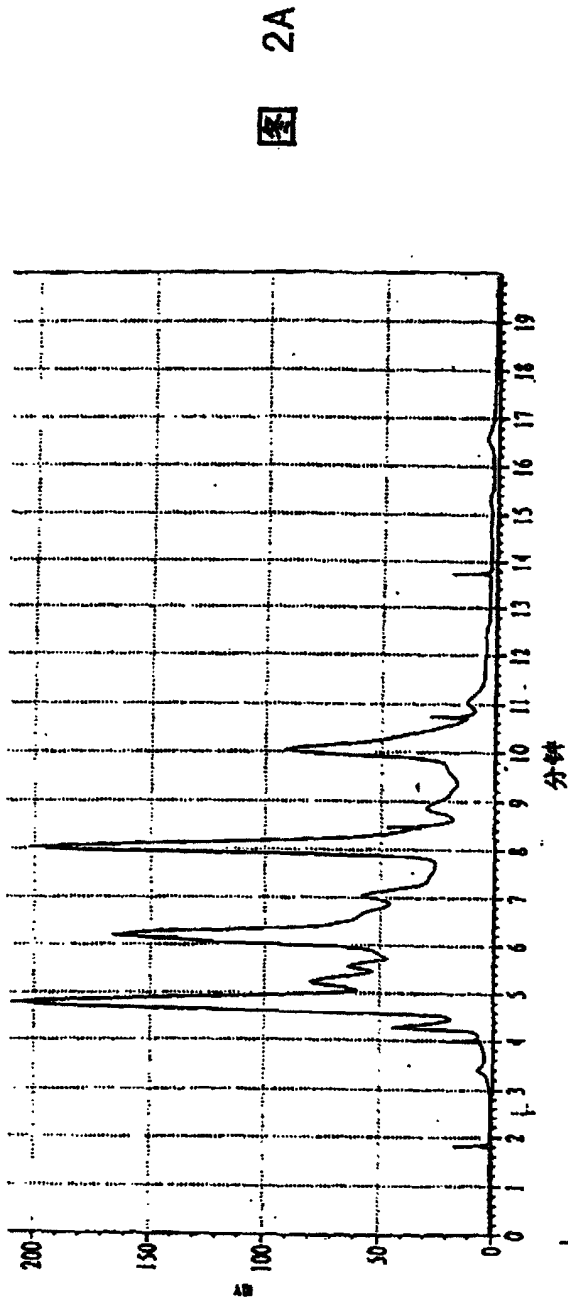


图 1B





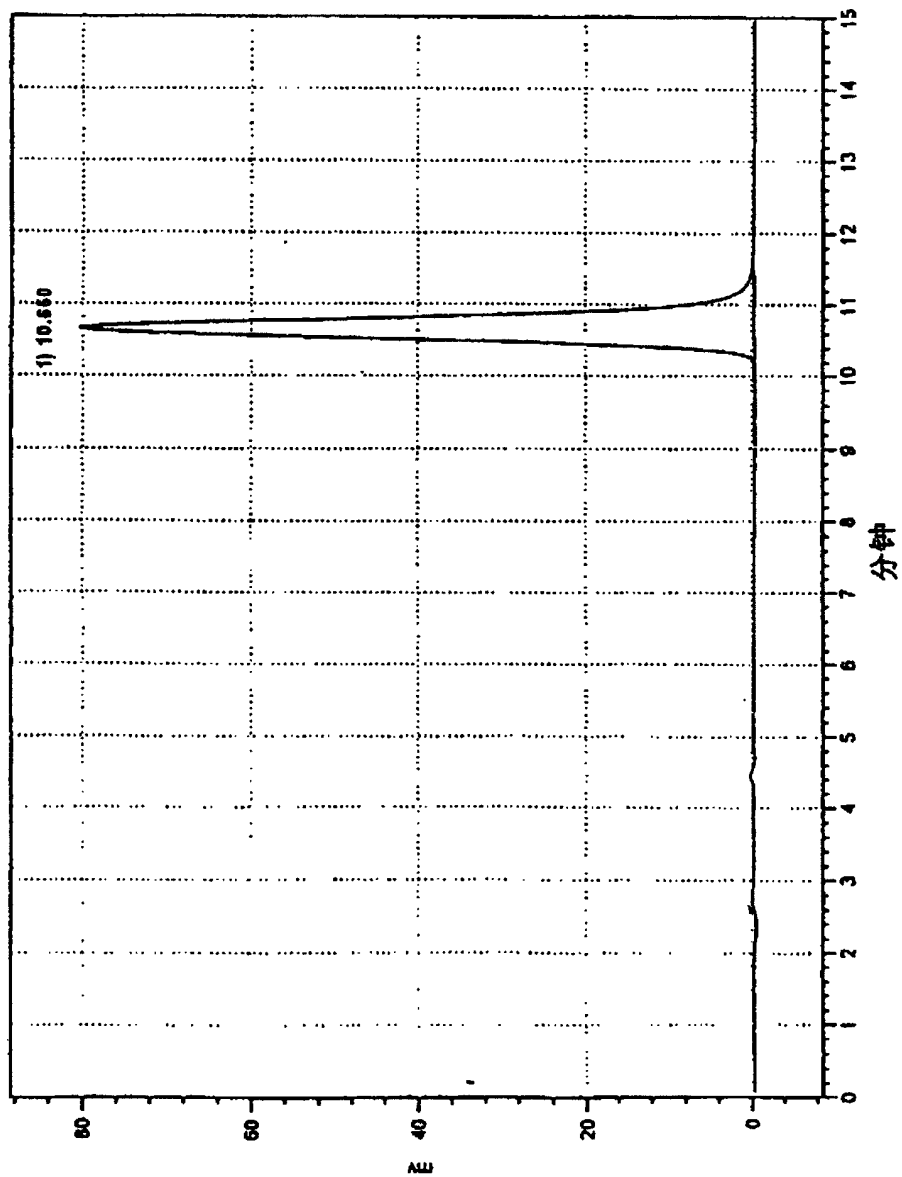
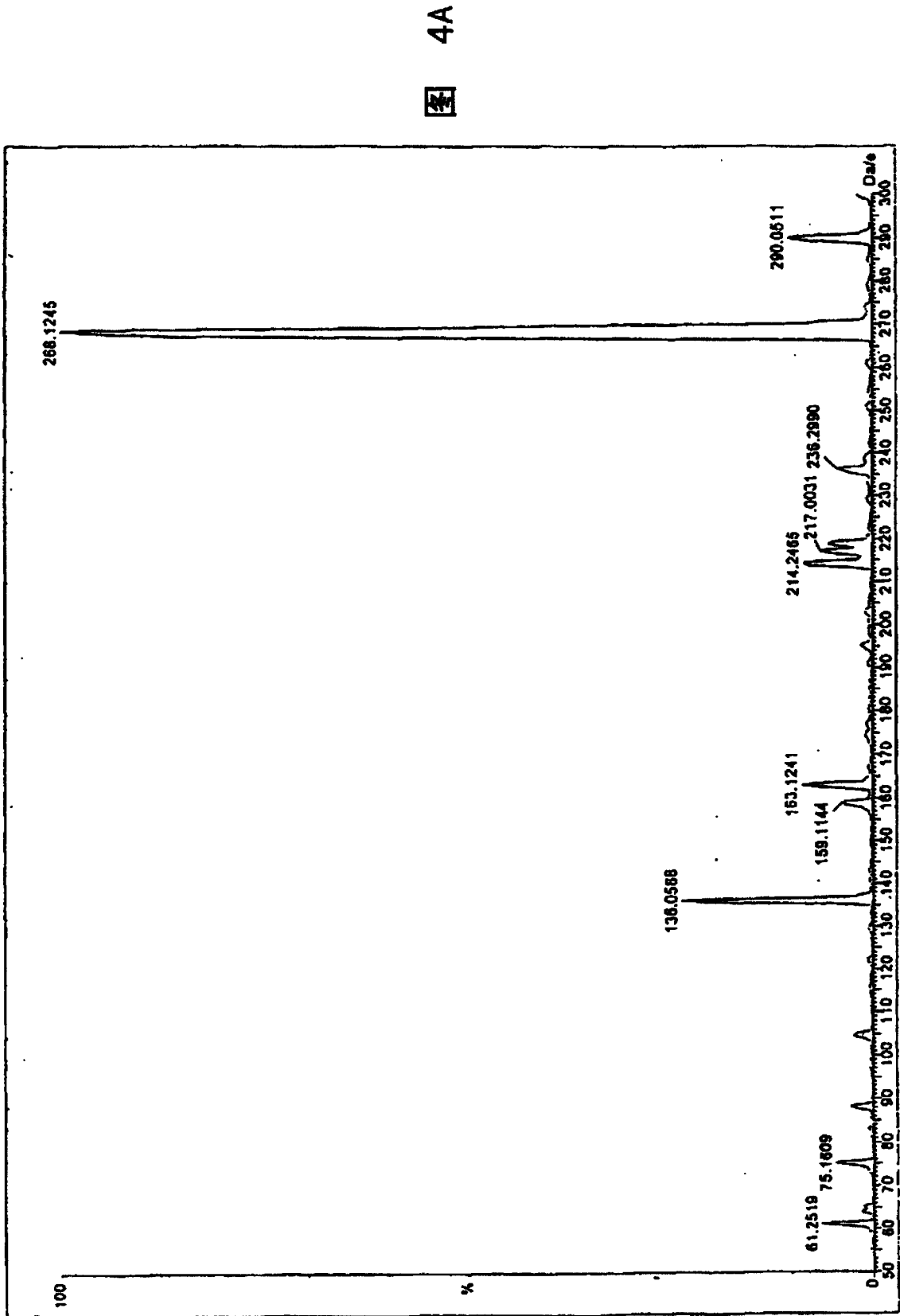


图 3



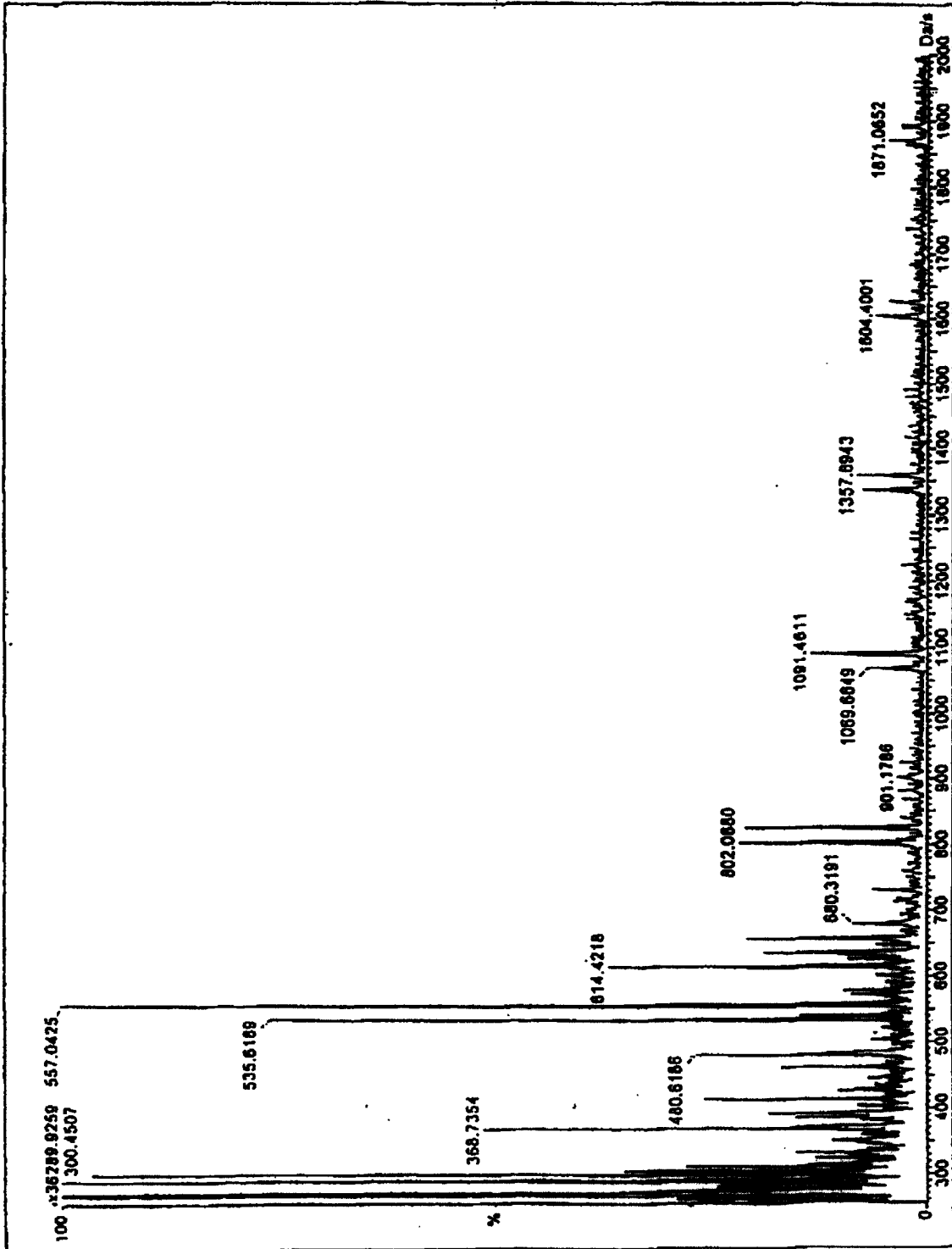


图 4B

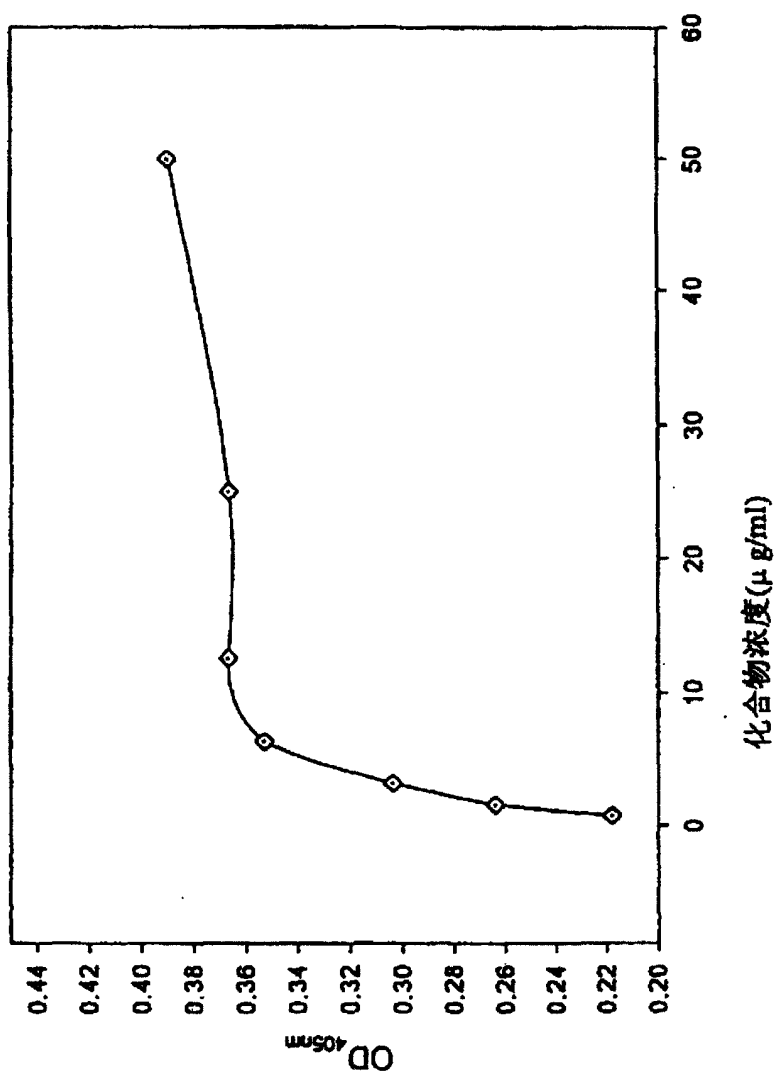


图 5

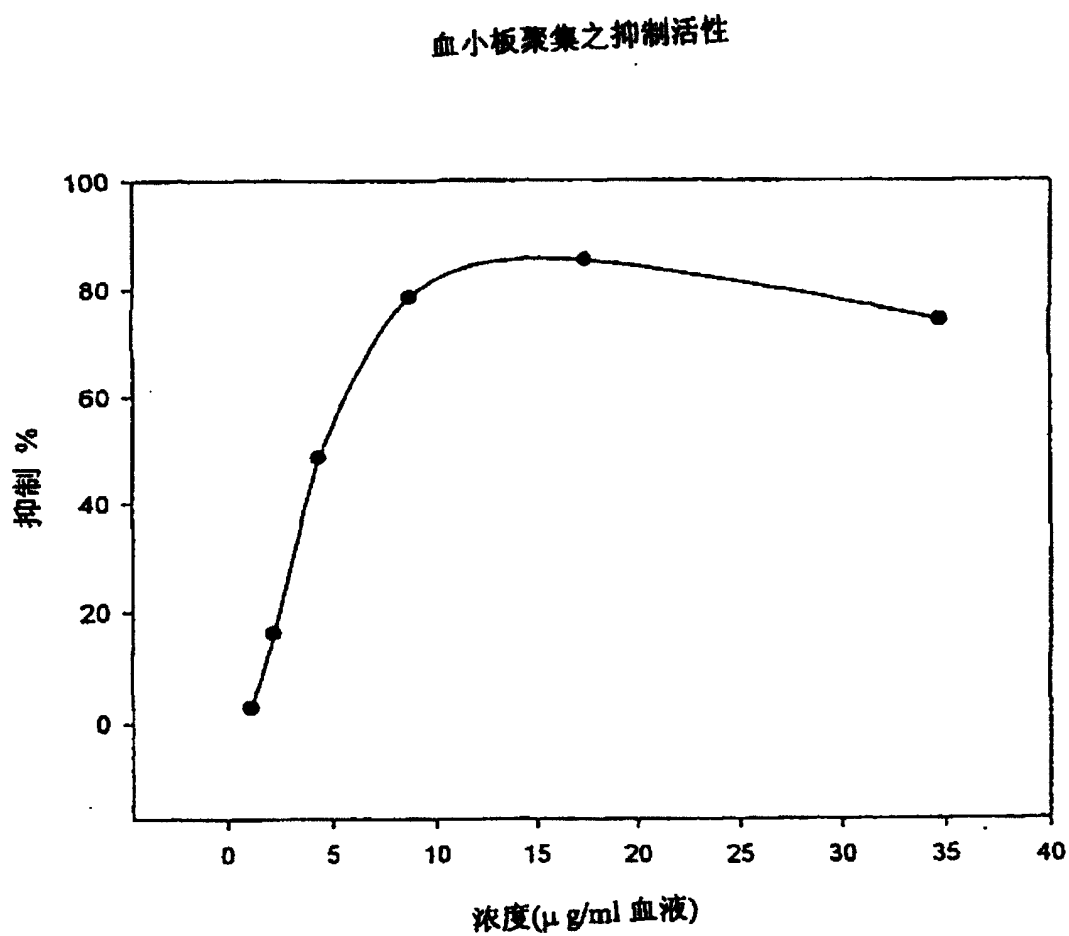


图 6A

抑制血小板聚集之活性与时间的关系

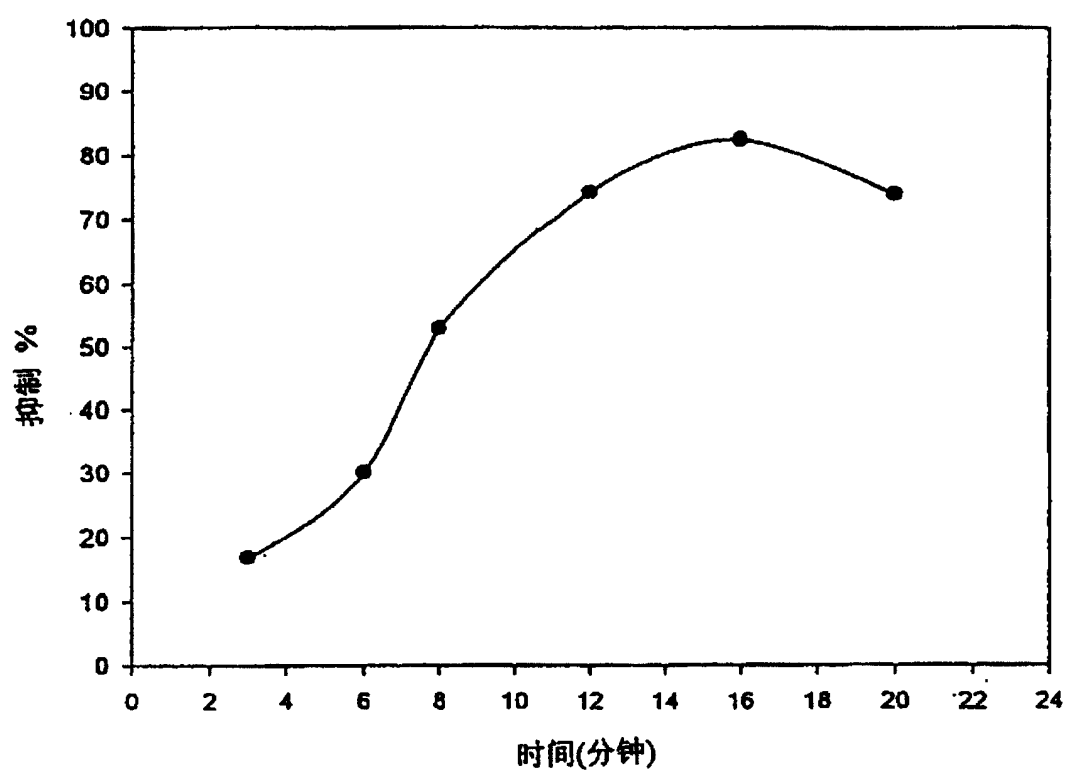


图 68

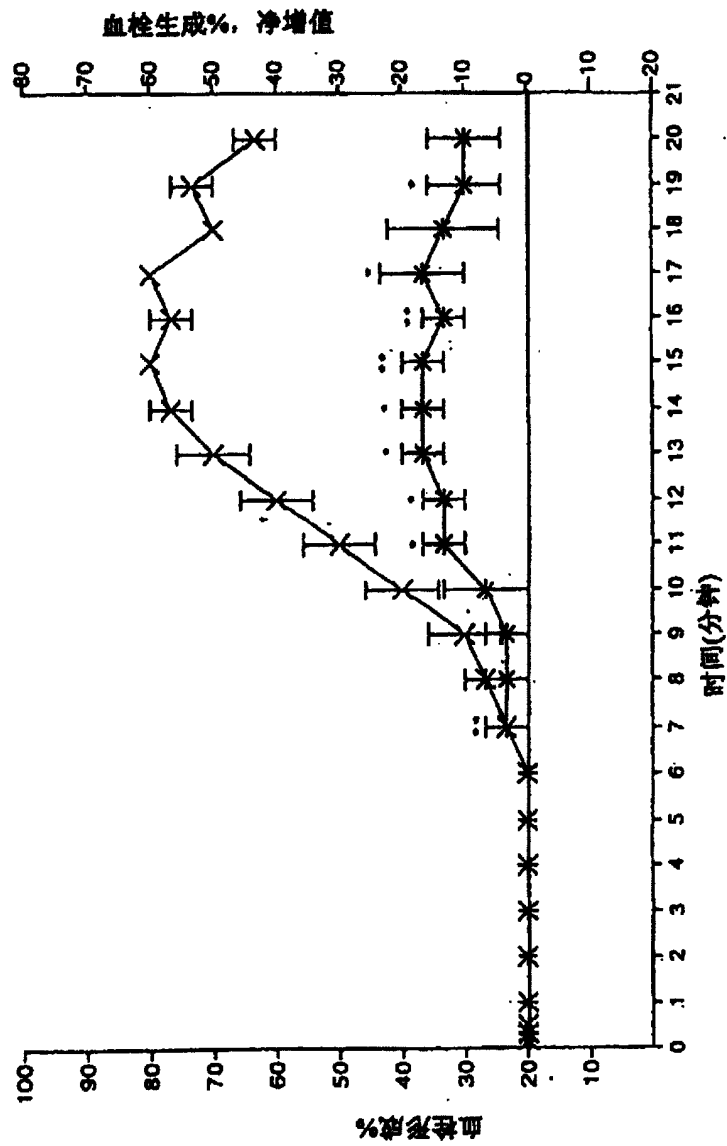


图 7A

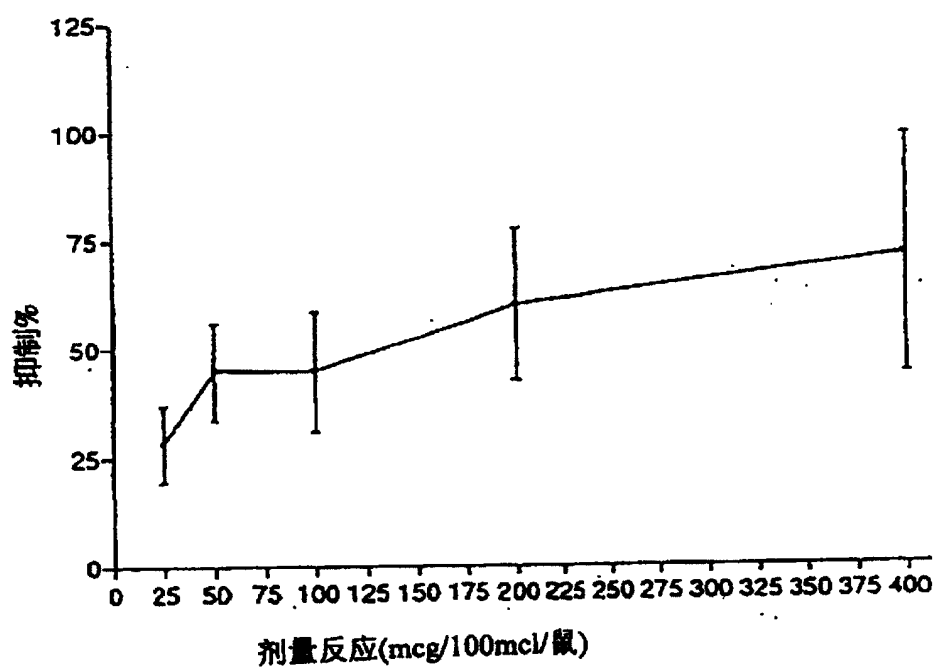


图 7B

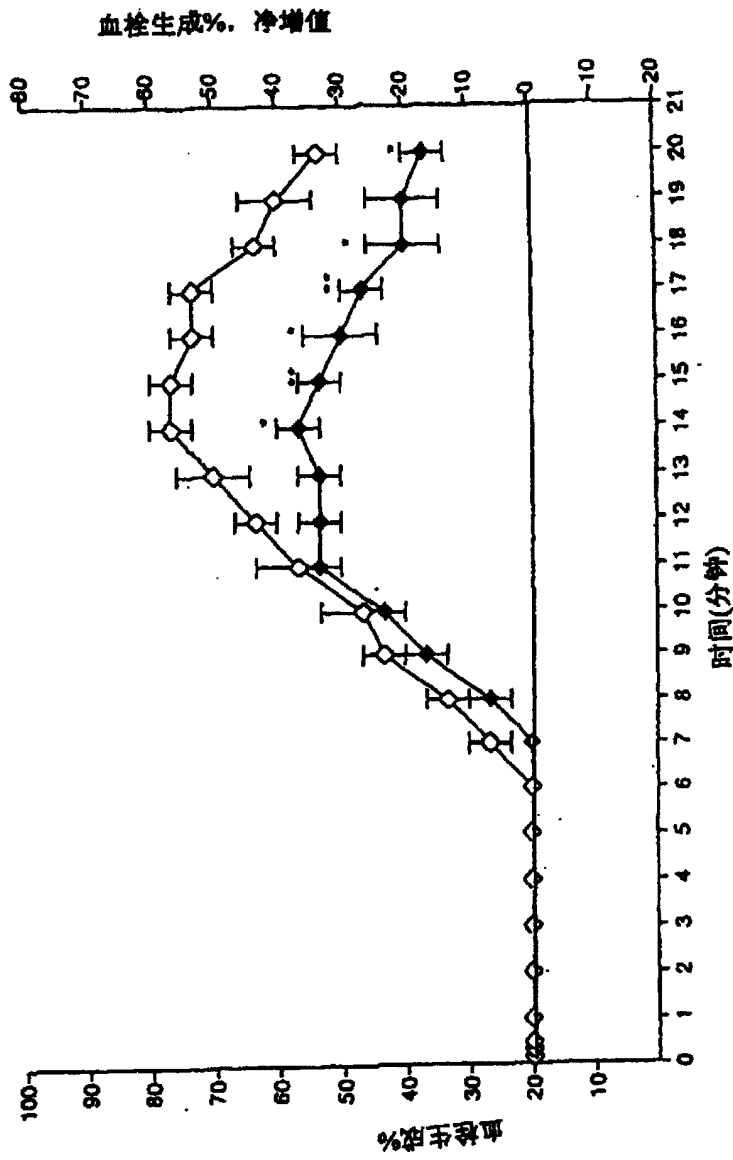


图 7C