

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-504958
(P2005-504958A)

(43) 公表日 平成17年2月17日(2005.2.17)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 30/88	GO 1 N 30/88	E
GO 1 N 27/62	GO 1 N 27/62	G
GO 1 N 30/06	GO 1 N 27/62	L
GO 1 N 30/26	GO 1 N 30/06	Z
GO 1 N 30/32	GO 1 N 30/26	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 167 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-508373 (P2003-508373)	(71) 出願人	504000568 ユニゲン・ファーマシューティカルス・インコーポレーテッド アメリカ合衆国ワシントン州98516, ラセイ, ノース・イースト, ウィラメッテ ・ドライブ 2660
(86) (22) 出願日	平成14年6月27日 (2002.6.27)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月25日 (2003.12.25)	(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠式
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/020602	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(87) 国際公開番号	W02003/002134	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開日	平成15年1月9日 (2003.1.9)		
(31) 優先権主張番号	60/301, 523		
(32) 優先日	平成13年6月27日 (2001.6.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療剤発見のために、天然産物ライブラリーを作製、スクリーニングおよびデレプリケーションする方法

(57) 【要約】

本発明は、概して、新規の生物活性治療剤、栄養補助食品および化粧用剤を発見するための PhytologixTM と呼ばれる技術基盤に関する。特に、本発明は、薬用植物の収集およびこれら植物に関する情報データベースの創設のための統合システムを含む。本発明はまた、改良された標準化された抽出および分画プロセスに関し、当該プロセスは、簡便さ、分離効率、ライブラリーの品質、プロセスの低コスト性、および、驚くべきスループットの面で、従来技術より顕著な利点を提供する。本発明は、ハイスループット生物学的試験データおよび国内の純粋な化合物ライブラリーと一緒に HPLC / PDA / MS のような技術を利用することによって、構造デレプリケーションプロセスの詳細を提供する。本発明は、従来技術法に比べてかなり効率的かつ正確であることが証明された。最後に、PhytologixTM 基盤は、新規の栄養補助食品や化粧用製品としての天然の COX-2 およびチロシナーゼ阻害剤の発見および開発の全プロセスを決定することによる現実的かつ効率的なプロセスとして認証されている。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 生物学的サンプルを同定し、収集する工程；
(b) 2種の溶媒系抽出法を用いてサンプルを抽出する工程；
(c) 2種の別々のハイスループット（H T P）分画法を用いて抽出物を分離し、同時に、各H T P分画の活性を決定する工程；
(d) 活性な分画をデレプリケーションし、化合物の存在を同定する工程；および、
(e) 工程（d）で同定された各新規の化合物の指標、薬理的および安全性プロフィールを得る工程、
を含む、新規の治療剤、栄養補助食品および化粧用剤を発見し開発する方法。

10

【請求項 2】

生物学的サンプルが、植物、微生物、菌類、鉱物、海洋、動物またはヒト起源の材料からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記生物学的サンプルが植物である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

収集されたサンプルの量が 1 g ~ 1 0 0 0 0 g である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記サンプルが、付記された薬用使用または作用機序に基づき選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

収集された各サンプルに関する収集フォームを作製する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記収集フォームは、サンプルに関する特定の情報（ラテン名、分布、収集場所、治療に関する情報、従来 of 調合、植物の同定、および、公開された参考文献を含む）を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記収集フォームに関する情報がデータベースに送られる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

データベースが、カスタマイズされた Access、Oracle、PostgreSQL、MySQL、および、Sequel で構成されるデータベースからなる群より選択される、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

データベース中の情報が、個々のフォームを用いて加入された個々の表に蓄積される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

データベースに保存された情報およびデータにアクセスするための特定のマクロおよび問い合わせを設計する工程をさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

収集された各サンプルに関して少なくとも 2 種の証拠標本を調製する工程をさらに含み、前記証拠標本は、自然に、および/または化学的に乾燥および/または保存された、十分な再生器官を含むサンプル全体を含み、同定目的のために分類学フォームが各証拠標本に添付された、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 13】

工程（b）の溶媒抽出法が、

(a) 適切な量のサンプルを摩砕する工程；
(b) 低極性溶媒と、高極性溶媒とからなる 2 種の有機溶媒の組み合わせを用いて摩砕したサンプルを抽出する工程；
(c) 有機抽出後にサンプルを乾燥させる工程；(d) 乾燥したサンプルを水性溶媒で抽

50

出する工程；および、

(e) 両方の抽出液から溶媒を蒸発させ、抽出物を単離する工程、
をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

サンプルの量が、1 g ~ 1000 g から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記低極性が、6 ~ 10 個の炭素を有するアルカン、1 ~ 4 個の炭素原子を有するハロゲン化アルカン（各炭素原子は、1 ~ 4 個のハロゲン原子を含む）、式 $R'COOR''$ で示されるエステル（式中、 R' は、1 ~ 6 個の炭素を有するアルキル基から選択され、 R'' は、1 ~ 8 個の炭素を有するアルキル基から選択される）、および、3 ~ 12 個の炭素を有するケトンからなる群より選択される、請求項 13 に記載の方法。

10

【請求項 16】

前記低極性溶媒が、塩化メチレン、酢酸エチルおよびクロロホルムからなる群より選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記高極性溶媒が、DMSO、THF およびアルコールからなる群より選択され、前記アルコールは 1 ~ 8 個の炭素を有する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

前記アルコールが、メタノール、エタノール、プロパノールおよびブタノールからなる群より選択される、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 19】

両方の抽出における溶媒の量が、抽出されたサンプル重量の 1 ~ 10 倍の量である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 20】

抽出が、振盪、音波破碎、還流、攪拌および加圧混合、ならびに、ろ過からなる群より選択された方法で行われる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 21】

工程 (b) で得られた抽出物が、生物学的試験のために、以下の工程：

(a) 有機抽出物の重量を測り、溶媒に溶解する工程；

(b) 水性抽出物の重量を測り、溶媒に溶解する工程；および、

30

(c) 各抽出溶液をサンプルマスタープレートの個々のセルに移す工程、
を含む方法により調製される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

有機抽出物を溶解させるための溶媒が、DMSO、DMF、THF、3 ~ 10 個の炭素を有するケトン類、および、1 ~ 5 個の炭素を有するアルコール類からなる群より選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

水性抽出物を溶解させるための溶媒が、水、DMSO、DMF、THF、3 ~ 10 個の炭素を有するケトン類、および、1 ~ 5 個の炭素を有するアルコール類からなる群より選択される、請求項 21 に記載の方法。

40

【請求項 24】

各溶液における抽出物濃度が、0.01 mg ~ 1000 mg / mL 溶媒の範囲である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

サンプルマスタープレートが、96、192、384、576、768、960、1152、1344、および、1536 ウェルプレートからなる群より選択される請求項 21 に記載の方法。

【請求項 26】

抽出物の分離が：

(a) パラレルクロマトグラフィーシステムまたはハイスループット精製 (HTP) シス

50

テムを用いる工程；

(b) 有機抽出物を順相プレパックカラムで分離する工程；

(c) 水性抽出物を逆相プレパックカラムで分離する工程；

(d) 検出器で溶出液を検出する工程；

(e) 分画を収集する工程；および、

(f) 溶媒を蒸発させる工程、

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

クロマトグラフィシステムが、2～4個の溶媒吐出ポンプ、溶媒ミキサー、および適切な自動ライン切り替え器を含む、請求項 26 に記載の方法。

10

【請求項 28】

クロマトグラフィが、周囲圧力、低圧、中間圧、または高圧の溶媒圧力で行われる、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

クロマトグラフィが、周囲温度、または 20～80 の温度で行われる、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

順相カラムが、シリカゲル、アルミナ、およびアミノプロピル、シアノプロピル、ジオールフロリジルまたはポリアミド、イオン交換樹脂からなる群より選択される樹脂で充填される、請求項 26 に記載の方法。

20

【請求項 31】

逆相カラムが、C-2、C-4、C-8、C-18、LH-20、XAD-4、XAD-16、およびポリスチレン-ジビニルベンゼンがベースの樹脂からなる群より選択された樹脂で充填される請求項 26 に記載の方法。

【請求項 32】

クロマトグラフィカラム中の樹脂の粒度が、10～200 μmである、請求項 30 または 31 に記載の方法。

【請求項 33】

クロマトグラフィカラムが、1～500 g の樹脂で充填される請求項 26 に記載の方法。

30

【請求項 34】

順相クロマトグラフィカラムが、6～10個の炭素を有するアルカン、式 R^1COOR^2 を有する有機エステル（式中、 R^1 は、1～5個の炭素を有するアルキル基から選択され、 R^2 は、1～6個の炭素を有するアルキル基から選択される）、および式 R^3OH で示されるアルコール（式中、 R^3 は、1～6個の炭素を有するアルキル基である）から選択された3種の有機溶媒の組み合わせで溶出される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 35】

逆相クロマトグラフィカラムが、DI水と、1～4個の炭素を有するアルコール、アセトニトリル、THF、または3～12個の炭素を有するケトンからなる群より選択された溶媒との2種の溶媒の組み合わせで溶出される、請求項 26 に記載の方法。

40

【請求項 36】

検出器が、100～1000 nmの範囲の単波長、連続波長または広帯域波長を用いたシングルまたはデュアルチャンネルを含む紫外線（UV）/可視光検出器である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 37】

検出器が、エレクトロスプレーイオン化または数個のスプレーイオン化チャンバー；イオントラップ、または、ポジティブまたはネガティブモードを備えるシングルもしくはトリプル四重極質量検出を含むMS検出器である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 38】

検出器が、プロトンまたは炭素プローブを含む核磁気共鳴（NMR）検出器である、請求

50

項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

検出器が、反射インデックス (R I) 検出器である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 4 0】

検出器が光散乱検出器 (L S D) である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 4 1】

工程 (d) の後に、生物学的試験のために抽出物分画を調製する工程をさらに含み、該調製する工程は、

(a) 有機抽出物からの分画を溶媒に溶解させる工程；

(b) 水性抽出物からの分画を溶媒に溶解させる工程；および、

(c) 分画溶液をサンプルプレートに移す工程、

を含む方法が用いられる、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 4 2】

有機抽出物および水性抽出物から得られた分画を溶解させるための溶媒が、それぞれ独立して、DMSO、DMF、THF、3 ~ 10 個の炭素を含むケトン、1 ~ 5 個の炭素を含むアルコール、および、2 ~ 3 種の溶媒の組み合わせからなる群より選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

溶液中の抽出物濃度が、0 . 0 0 1 m g ~ 1 0 0 m g / m L 溶媒である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

サンプルプレートが、9 6、1 9 2、3 8 4、5 7 6、7 6 8、9 6 0、1 1 5 2、1 3 4 4、および、1 5 3 6 ウェルプレートからなる群より選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

活性な分画のデレプリケーションが、

(a) サンプルの活性データを収集する工程；

(b) サンプルの物理的特性、分光データおよび構造データを収集する工程；

(c) 収集されたデータを分析する工程；

(d) サンプルの特性に関して商業的データベースを検索する工程；および、

(e) 活性な分画に関する結論を得る工程、

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 6】

測定された活性が、酵素阻害、受容体結合、遺伝子発現、細胞の機能調節、タンパク質生産、動物の機能調節、ならびに、動物生理学的、神経学的および挙動の機能調節、動物の病気モデルの操作、および、生物学的な機能のその他の測定からなる群より選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

活性データが、抽出物、抽出物の分画、精製化合物、半合成および合成化合物から収集される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

デレプリケーションプロセスで収集された物理的特性データが、吸収に基づくクロマトグラムからの保持時間、または、UV / VIS、屈折率、レーザー光散乱パターン、溶媒溶出量、質量；pH、溶解性、および、log P の変化から選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 9】

収集された分光情報は、UV / VIS スペクトル、マススペクトル (分子イオンおよびフラグメンテーションイオンを含む)、NMR スペクトル、および、光散乱スペクトルから選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 0】

10

20

30

40

50

構造情報は、マスフラグメンテーションパターン、および、ドーター/グランドドーターイオンのマススペクトル；一次元および二次元核磁気共鳴分光データからの、プロトン、炭素、リンおよびその他の元素のケミカルシフト；赤外線スペクトル、および、UV吸収スペクトルから選択される、請求項45に記載の方法。

【請求項51】

物理的特性、分光データおよび構造データが、溶出液の分画を1またはそれ以上の検出器に分割することにより抽出物を分離する際に収集される、請求項45に記載の方法。

【請求項52】

物理的特性、分光データおよび構造データが、個々の分画の分析からの高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)により収集される、請求項45に記載の方法。

10

【請求項53】

HPLCが、2つの溶媒ポンプ、溶媒ミキサー、樹脂を含むステンレス鋼カラム、カラムオープン、および、1またはそれ以上の検出器で構成される、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

カラムが、シリカゲル、アルミナ、ポリアミド、アミノプロピル、シアノプロピル、ジオールフロリジル、および、イオン交換樹脂からなる群より選択される順相樹脂で充填される、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

カラムが、C-2、C-4、C-8、C-18、LH-20、XAD-4、XAD-16、および、ポリスチレン-ジビニルベンゼンベースのポリマーからなる群より選択された逆相樹脂で充填される、請求項53に記載の方法。

20

【請求項56】

樹脂の粒度が、1~100 μ mから選択される、請求項53に記載の方法。

【請求項57】

クロマトグラフィーカラムが、0.1~50gの樹脂を含む、請求項53に記載の方法。

【請求項58】

商業的データベースが、Dictionary of Natural Products、ケミカルアブストラクトサービスのレジストレーションファイル、NAPROLETT、MEDLINE、NERAC、DEREP、および、Bioactive Natural Product Databaseからなる群より選択される、請求項45に記載の方法。

30

【請求項59】

新規の成分が、単離、精製および同定プロセスを対象とした生物学的試験により同定される、請求項1に記載の方法。

【請求項60】

薬理学プロフィールは、生物学的システムの活性および機能、生化学的材料、および遺伝子標的を調節する能力である、請求項1に記載の方法。

【請求項61】

活性および機能を調節する能力が、酵素阻害、受容体結合、遺伝子発現、細胞の機能調節、タンパク質生産、動物の機能調節、および、動物の病気モデルの操作からなる群より選択された生物学的な機能の測定により決定される、請求項60に記載の方法。

40

【請求項62】

遺伝子標的が、病気または代謝の発現、または、生理学に関連する遺伝子である、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

遺伝子またはその部分がヒト起源である、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

病気に関連する遺伝子が、心臓血管疾患、呼吸器疾患、腎臓疾患、肝臓疾患、膵臓疾患、胃腸疾患、血液学的疾患、代謝病、神経疾患、老化、免疫疾患、生殖系疾患、感染症、および、骨疾患からなる群より選択された病気に関連する、請求項62に記載の方法。

50

【請求項 65】

病気に関連する遺伝子が、炎症、免疫反応、エネルギー代謝、創傷治癒、アレルギー、閉経期、老化、酸化ストレス、および、ガンからなる群より選択された症状に関連する、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 66】

病気、代謝または生理学に関連する遺伝子の発現が、このような遺伝子のメッセンジャー RNA のレベルにより測定される、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 67】

病気、代謝または生理学に関連する遺伝子の発現が、ノーザンブロット分析、ドットブロットハイブリダイゼーション、DNA マイクロアレイハイブリダイゼーション、および、10 定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (gPCR) からなる群より選択された方法により測定される、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 68】

安全性プロフィールが、相当量の化合物を投与した際の、生物学的システム、生化学的材料、および分子生物学的な標的の正常な活性および機能を維持する能力の測定により決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 69】

同定された新規の化合物を市販可能な製品に開発する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 70】

前記水性溶媒が、水、酸水溶液、塩基溶液、および、緩衝溶液からなる群より選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 71】

前記酸水溶液、塩基溶液、および、緩衝溶液が、pH 範囲 1 ~ 14 の有機酸または無機酸、塩基、および塩から選択される、請求項 70 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、概して、新規の生物活性を有する治療剤、栄養補助食品および化粧用剤の発見および開発に関する、PhytologixTM と呼ばれる技術基盤に関する。本発明は、生物資源調査およびインフォマティクス、パラレルおよび予備精製技術、オンライン (HTTP/UV/MS) およびオフライン (HPLC/PDA/MS) デレブリケーション、ハイスループット生物学的試験技術、コンピューター化データベース検索方法、ならびに、医薬、栄養補助食品および化粧分野における製品開発のための通常のアプローチに関する詳細を提供する。

【0002】

発明の背景

天然産物は、薬用植物の従来の使用のための科学的基礎を形成してきただけでなく、現代医学においても重要な役割を果たしてきた。(Newman et al. (2000) Nat. Prod. Rep. 17: 215 - 234)。1983 ~ 1994 年の間に承認された薬物の再調査によれば、天然由来の薬物は、承認された 78% の抗菌剤、75% の血小板凝集阻害剤、61% の抗ガン剤、48% の抗低血圧剤、47.6% の抗潰瘍剤、および 32.5% の抗炎症剤に寄与している。(Cragg et al. (1997) J. Nat. Prod. 60: 52 - 60)。しかしながら、鎮痛剤、抗うつ剤、抗ヒスタミン剤、抗不安剤、強心性剤、抗菌類剤、および、催眠剤が、主に合成由来のものである。

【0003】

天然産物は、可能性のある薬物の手がかりを発見するための、高度に多様化した構造的資源であることが証明されている。169,000 種以上の既知の天然産物がある。(Th 10

e Combined Chemical Dictionary, Chapman and Hall/CRC, version 10:2 Feb. 2002)。10,495種の天然産物と、5757種のトレード薬物の分析に基づき、天然産物が1748種の異なる環系を有することがわかり、すなわちトレード薬物で発見された807種の異なる環系より2倍多様である。(Lee and Scheneider (2001) J. Com. Chem 3: 284-289)。また、トレード薬物で発見された環系の約35%は、天然産物でも発見されたが、トレード薬物において天然産物で発見された環系のわずか17%しか同一の対応物質がない。天然産物は、構造的な手がかりとして機能的なだけでなく、トレード薬物と非常に類似した構造的および薬理作用団特性を有する(Lee and Scheneider, (2001) J. Com. Chem 3: 284-289; Bemis and Murcko (1996) J. Med. Chem. 39: 2887-2893)。10,495種の天然産物と5757種のトレード薬物との比較において、天然産物の平均計算分子量がトレード薬物の平均計算分子量とほぼ同一であること(356と360); および、平均log p値が天然産物(2.9)のほうがトレード薬物(2.5)の値よりわずかに高いことがわかった。天然産物において、1分子あたりの水素供与体はトレード薬物より少なく、1分子あたりの窒素もトレード薬物より少ない; トレード薬物や合成薬物よりかなり多数のブリッジヘッド原子を有する; および、1分子あたりのキラル中心がより多い(Henkel et al. (1999) Angew. Chem. Int. Ed. 38: 643-647); しかしながら、天然産物およびトレード薬物は両方とも、1分子あたりの酸素の平均数が類似しており、少なくとも2つの「rule-of-5」に背く化合物を同じパーセンテージで有する。(Lipinski et al. (1997) Adv. Drug Delivery Rev. 23: 3-25)。

【0004】

コンビナトリアル合成、コンピューターを利用したドラッグデザインおよび超ハイスループットスクリーニングのような新しい技術の進歩と共に、テンプレートとして天然産物を用いた低分子物質ライブラリーの設計における感心が増してきている。(Hall et al. (2001) J. Combinatorial Chem 3(2): 125-150; Wang and Ramnarayan (1999) J. Comb. Chem. 1: 524-533)。コンビナトリアルライブラリーは溶液中で作製することができるが、これまでに作製されたほとんどのライブラリーは、固相抽出などの固相合成技術に依存しており、主に目的とする合成化合物の精製に用いられている。(Desai et al. (1994) Drug Devel. Res. 33: 174-188)。遺憾ながら、複数の天然産物テンプレートから、特に複数の環および複数のキラル中心骨格を含む化合物を含むライブラリーを作製するための合成アプローチにおいて、重大な制限がある。半合成アプローチに関する明らかな制限は、特定の骨格の改変や決定的な官能基位置を、多様化することが出来ない点である。これまで、公開された全ての化合物ライブラリーは、出発原料の収集、ならびに、特定の条件下で最適化されなければならない特定の反応または反応の順序を用いて作製されてきた。(Weber (2000) Current Opinion in Chem Biol. 4: 295-302)。加えて、既知のリード天然産物から合成ライブラリーを開発するためには、改変され得る天然産物テンプレートの可能性のある部位を定義するために構造と活性との関係に関する相当量の情報を必要とする。従って、コンビナトリアル合成化学に対する一般的なアプローチは、利用可能な薬理的プロファイルに基づく特定のタイプの天然産物の同定、および、足場またはテンプレートへの構造の解体を含む。

【0005】

注目された天然産物ライブラリーの設計は、コンビナトリアル合成および計算機化学にそのルーツがある。(Wessjohann (2000) Current Opinion in Chem Biol. 4: 303-309; Kolb (1998) Prog. Drug Res. 51: 185-217)。特定のタイプの化合物を標的とする特定のタ

イブのライブラリーを設計する試みがなされており (Stahura et al. (2000) J. Med. Model 6: 550 - 562)、この試みは、特定の治療標的に焦点を当てているか、または、基準として生物学的利用能を含む (Shu (1996) J. Nat. Prod. 61: 1053 - 1071)。多くの異なるタイプの天然産物テンプレートが開発されており、うまく作製された天然産物ライブラリーとしては、以下のような化合物からのアルカロイド様ライブラリー: ベンジルアミン (Green (1995) J. Org. Chem. 60: 4287 - 4290)、キナゾリン (Wang and Ganesan (2000) J. Comb. Chem. 2: 186 - 194)、インドリ (indoly) ジケトピペラジン (Loevezijin et al. (1998) Tetrahedron Lett. 39: 4737 - 4740)、マピシン (mapicicine) 類似体 (Josien and Curran (1997) Tetrahedron 53: 8881 - 8886)、ヨヒンビン類似体 (Ni et al. (1996) J. Med. Chem. 39: 1601, Atuegbu et al. (1996) 4: 1097 - 1106) およびオリゴ複素環 (Boger et al. (2000) J. Am. Chem. Soc. 122: 6382 - 6394); ならびに、以下のような化合物から作製されたフラボノイド様ライブラリー: フラボン類似体 (Marder et al. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun 249: 481 - 485)、およびベンゾピラン (Nicolaou et al. (2000) J. Am. Chem. Soc. 122: 9939 - 9976, Mason et al. (1999) J. Med. Chem. 42: 3251 - 3264) が挙げられる。 20

【0006】

概して、合成ライブラリーは、HPLCに基づき約70~80%の純度を有する精製された単一の化合物を1~2mgの量で含む。合成プロセスで生じるその他の化学成分が共存するために、誤ったポジティブ、誤ったネガティブおよびその他の厄介な問題により生物学的なスクリーニング分析が顕著に影響を受ける可能性がある。コンビナトリアルライブラリーの設計において、低収率、精製の困難さ、および、キラル中心の損失を防ぐために、反応選択性および効率の慎重な最適化が要求される。天然産物の特定の望ましい生物学的特性が、簡単な官能基修飾を含むかなり小さいライブラリーでも改善され得ることが実証されている。(Hall et al. (2001) J. Combinatorial Chem. 3 (2): 125 - 150)。これまで、農業や食品産業におけるコンビナトリアルライブラリーの使用はほとんど報告されていない (Wang and Rebitson (1999) in Chemicals Via Higher Plant Bioengineering, Shahidi ed., Kluwer Academic/Plenum Publ. Pp 91 - 105)。加えて、栄養補助食品や化粧品産業におけるこのようなライブラリーの用途に関する報告もない。 30

【0007】

Grabley等は、天然産物をベースとしたライブラリーからの薬物発見に関する詳しい総評を公開した。(Grabley et al. (2000) Ernst Scheering Res. Found Workshop 32: 217 - 252)。一般的に、天然産物のスクリーニングは、粗抽出物から始める。特に、植物のバイオマスは、複数の溶媒で数回抽出物され、溶媒は一般的にそれらの極性に基づき選択される。遺憾ながら、このような粗抽出物は多数の化合物を含み、それらは低濃度で存在する。一般的に、これは、主成分から生じる生物活性のみが同定されるという結果になる。有効な活性を有するが検出できる限界の濃度未満で存在する化合物は、まったく失われてしまう可能性がある。加えて、これは、類似の弱い活性成分による相乗効果や共通成分による非特異的な干渉のために誤ったポジティブ結果に導かれる可能性がある。 40

【0008】

これまで、ハイスループットスクリーニングや生成物発見に適した天然の源から直接的に天然産物ライブラリーを作製する方法はほとんど報告されていない。その方法の一例が近年Gary等のWO00133193 (2000)により報告された。Gary等の方法 50

は、(a) 生物学的な源材料を、アルコール/水またはヘキサン、続いてアルコール/水で徹底的に抽出する工程；(b) ポリアミドカラムで抽出物を溶出させることにより生物学的試験の干渉物を溶媒抽出物から除去する工程；(c) ポリアミドカラムからの溶出液を段階的な勾配で固相抽出プロセスで処理し、特定の分画（一般的に4）を収集する工程；(d) これら分画をそれぞれHPLCでさらに精製し、生物活性化合物の検出に基づく化合物ライブラリーを作製する工程；および(e) 自動化システムにより作製した標準濃度で精製化合物を収集する工程を含む。この方法論はいくつか欠点がある。第一に、抽出溶媒としてアルコール/水混合物を使用すると、バイオマスから全ての可能性のある生物学的に活性な成分を抽出できない可能性がある。良い例が多糖類であり、これは、アルコール/水に溶解しない場合があるため、植物バイオマスから抽出されない可能性がある。しかしながら、多糖類は、免疫調節および抗腫瘍効果があることがわかっており、医薬、栄養補助食品および化粧品産業において用いられてきた非常に重要な天然産物分類である。第二に、ポリフェノールやタンニンは、生物学的に活性な成分であり(Kolodziej et al. (2001) *Planta Med.* 67: 825 - 832; Abete et al. (2001) *J. Nat. Prod.* 64: 1010 - 1014)、これらは、多くのポピュラーな薬用植物産物の効能、例えば緑茶からのEGCGおよびその他のカテキンおよびフェノール化合物(Noe et al. (1999) *Life Sci.* 65: PL241 - 246)、ブドウの種およびブドウの皮(Cantos et al. (2001) *J. Agric. Food Chem.* 49: 5052 - 8)の効能に寄与する。Gary等が説明する方法を用いてこれら成分を植物抽出物から除去することにより、病気の予防および治療において有効で価値があることが実証された生物活性成分が相当失われる結果に陥る可能性がある。第三に、Gary等により開示されたプロセスは、時間がかかり高価なプロセスであり、最終的な化合物ライブラリーを得るために、複数の固相抽出およびカラムクロマトグラフィーの使用が必要である。最終的に、発明者等は、可能性のある生物学的なプロフィールまたは価値を理解する前に、各ウェルに関する既知の濃度および構造情報に力を入れている。このような試みもまた、解析、分類および貯蔵することに関して非常に高価であり、時間がかかる可能性がある。

10

20

30

40

50

【0009】

5mg以上の量で純度80%以上の6,700種の化学物質が収集された過剰でない純粋な化合物のライブラリーを作製するために計画された共同プロジェクトが、Bindseil等により報告された(*Drug Discovery Today* 6: 840 - 847 (2001))。バイオマテリアルは、679種の植物、2665種の細菌株および1425種の真菌類の株からなる。非遍在的な二次代謝に関して、HPLC/ELSD/DADおよびLC/MSを用いて、抽出前にバイオマテリアルをプレスクリーニングした。次に、フラッシュカラムクロマトグラフィーで単離を行い、構造情報を収集し、400種のランダムに選択された化合物の完全な構造を決定した。構造デレプリケーション法は、保持時間およびLC/MSデータに基づく分子量を参照した検索、ならびに、市販のデータベース(*Dictionary of Natural Products*)との比較を含む。基礎構造をさらに定義し、完全な構造の解明を提供するために、2D-NMRおよびその他の技術を利用した。上記方法で作製された純粋な化合物のライブラリーを9種の異なる標的に対してスクリーニングしたところ、反応率および確証率の面で合成ライブラリーよりも優れていることが示された。

【0010】

Stewart等は、Molecular Nature社で純粋な天然産物ライブラリーを作製する試みについて報告している。(Stewart et al. (2000) *Saponins, in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants*, Oleszek and Marston (eds.) pp. 73 - 77)。このライブラリーに関する化合物は、パラレル順相カラムクロマトグラフィー、続いて、C-18および/またはイオン交換クロマトグラフィーを用いて単離された。化合物をライブラリーに受け入れさせるために、HPLC、NMR、MSおよびGC/MS

の組み合わせによる構造的な照合により化合物を > 90% 純粋にしなければならない。微生物培養液から二次代謝産物ライブラリーを作製する方法が Schmid 等により報告された (J. Biomol. Screening 4: 15 - 25 (1999))。該ライブラリーは新規の自動化プロセスを用いて作製され、該自動化プロセスは、アンバーライト XAD-16 カラム、続いてスチレン-ジビニルベンゼン樹脂を用いたクロマトグラフカラム分画化、逆相 C-8 および C-18 ならびにその他のタイプの固相抽出 (SPE) により上清を培養液から多段階で分画化することに基づく。この試みにおいて、自動法 (部分的に手動の介入がある) に基づく各分画において、より高い純度の化合物が得られた。しかしながら、この方法は、いくつかの制限がある。例えば、SPE は、制限された分画数が大容量で得られる段階的な勾配を用いており、96 ウェル様式で分画を集める適切な方法ではない。最後に、Kingston 博士は、抗ガン薬発見のための天然コンビナトリアルライブラリーの作製を開示した。(Kingston (2001) Abs. Papers Amer. Chem. Soc. 221: ORGN 199; (1997) Abs. Papers Amer. Chem. Soc. 214: AGRO124)。

10

20

30

40

50

【0011】

ゲノミクス、酵素学および生物学における技術的開発により、コンビナトリアル生合成を利用した天然産物の生産のための方法がもたらされた。(Khosia (2000) J. Org. Chem 65: 8127 - 8133, Hutchinson (1998) Current Opinion Microb. 1: 319 - 329)。例えば、エリスロマイシンポリケチドシターゼの複数の遺伝的改変により、新規の人為的な天然産物ライブラリーが作製された。(McDaniel (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1846 - 1851)。コンビナトリアル生合成ライブラリーが、土壌から単離された大きい DNA 断片を Streptomyces 宿主にクローニング (Wang et al. (2000) Org. Lett. 2: 2401 - 2404)、グリコシルトランスフェラーゼが触媒した形質転換 (Thorson et al. (2001) Abst. Papers Amer. Chem. Soc. 221: Carb 19) により構築された。

【0012】

オンライン構造デレプリケーションのためのハイスループット精製、LC/PDA、LC/MS/MS および LC/NMR における近年の開発、ならびに、インフォマティクデータベースの創設は、生物活性を有する天然産物を研究する方法を根本的に変えた。デレプリケーションの最初の目的は、活性な抽出物または分画から既知化合物を同定し、これら既知化合物の不必要な単離を回避することである。収集された情報を評価するのに十分な構造データベースの選択は、デレプリケーションプロセスにとって重要である。(Corley and Durlley (1994) J. Nat. Prod. 57: 1484 - 1490)。ケミカルアブストラクトサービスのレジストレーションファイル (CA, NAPROLERT, REGISTRY, BEILSTEIN, MEDLINE 等のサブデータベースを含む)、および Dictionary of Natural Products (Bioactive Natural Product Database および DEREPEP データベースを含む) が、最も包括的なデータベースのうちの2つである。

【0013】

HPLC/UV/MS を用いた活性粗抽出物のデレプリケーションが、サブトラクションで得られた生物活性データに加えて、Cordell および Shin により報告された (Pure Appl. Chem. 71: 1089 - 1094 (1999))。この研究において、活性植物抽出物の分析は、HPLC C-18 カラムを用いて、アセトニトリル/水勾配で30分間溶出させ、単波長UV検出およびESI-MSをポジティブおよびネガティブのデュアルモードで行われた。抽出物のイオンクロマトグラム (ELC) からのUV吸収特性、分子量およびイオンフラグメンテーション情報を、NAPROLERT および Dictionary of Natural Products を用いて分析した。Julian et al. (1998), Anal. Chem. 70: 324

9 - 3 2 5 4 により説明されたように、LC - ESI - MS技術もまた、粗天然抽出物を量的に区別するのに利用された。簡単に言えば、菌類培養物からのエタノール/水抽出物の分離は、C - 18カラムを用いたデュアル - カラムHPLCシステムで、25分間、アセトニトリル/水/酢酸アンモニウム勾配を用いて行われた。類似性インデックスは、ESI - MS器具の陽イオンモードからの電荷率に対するHPLC保持時間と質量に基づいている。しかしながら、この方法論は、ポジティブモードにおいて適度な分子イオンピークを与える限られた構造情報と限られたタイプの化合物に関するに関する定性的結果に限定されていた。Wolfenderの報告で実証されたように(Wolfender et al. (1995) J. Mass Spectr. Rapid Commun. In Mass Spectr. S35 - S46)、一つの粗植物抽出物中での全ての二次代謝産物の最適なイオン化を可能にする単一のイオン化干渉がない。ES、APCI、TSPまたはCF - FABのような様々なイオン化技術が、LC/DADおよびMS/MSと共に必要である。信頼できる再現性を有するMS/MSフラグメンテーションスペクトルの検索可能なライブラリーを作製するために、マススペクトロメトリーから収集された構造情報を拡張することが非常に有用である。(Baumann et al. (2000) Rapid Comm. In Mass Spectr. 14: 349 - 356)。

10

【0014】

Bradshaw等は、精製された天然産物ライブラリーのデレプリケーションのための迅速かつ容易な方法を開示した。(Bradshaw et al. (2001) J. Nat. Prod. 64: 1541 - 1544)。該方法は、LC/MSからのその分子量を含む各構造、および、NMRデータから得られたメチル、メチレンおよびメタン基の数の正確な総数をリンクさせたテキストファイルを検索することを含む。検索は、特定のフォーマット - SMILES (商業的データベースから変換されたもの)における化学構造情報を含む、カスタマイズされたソフトウェアを用いる。

20

【0015】

天然産物の化学構造は、限定された量の材料を用いて、クライオプローブを含むNMR器具を利用して迅速に同定することができる(Russell et al. (2000) J. Nat. Prod. 63: 1047 - 1049)。より予測可能なケミカルシフトが、適量の公開された国内のNMRデータ(Smith et al. (2001) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 41: 1463 - 1469)と共に、構造解明プロセスの時間と正確さを顕著に改善する(Patchkovskii and Thiel (1999) J. Computational Chem. 20: 1220 - 1245; Grzonka and Davies (1998) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 38: 1096 - 1101; Schutz et al. (1997) Fresemus J. Anal. Chem. 359: 33 - 41)。加えて、HPLCを、NMRおよびマススペクトロメトリー(MS)と直接つなげることにより、さらにより多くの構造情報が得られ、デレプリケーションプロセスにおける結論の質を顕著に高める(Lindon et al. (2000) J. Chromatogr. B 748: 233 - 258)。

30

【0016】

ハイスループットスクリーニング技術の開発は、1980年代の中ごろに始まった。実験情報管理システムと一体化されたロボット操作によれば、小型化されたシグナルリーディングシステムと組み合わせて、1年あたりの分析につき事実上数百万のサンプルのスループットスクリーニングが可能になる(Lin (1995) J. Food & Drug Anal. 3: 233 - 242)。天然産物ライブラリーのスクリーニングが、多様な生物学的標的に対して(Virador et al. (1999) Analytical Biochemistry 270: 207 - 219)、生化学的標的に対して(Noreen et al. (1998) J. Nat. Prod. 61: 2 - 7)および、ゲノム標的に対して(Ghai (1999) 米国特許第5,955,269号)なされた。cDNA - フェージディスプレイを用いて天然産物受容体を機能同定するために、ディスプレイ

40

50

クローニング技術が開発されている (S c h e e t a l . (1 9 9 9) C h e m B i o l . 6 : 7 0 7 - 7 1 6) 。

【 0 0 1 7 】

酵素シクロオキシゲナーゼ (C O X) の阻害は、ほとんどの非ステロイド系抗炎症剤 (N S A I D S) に帰属する作用機序である。2つの別個のアイソフォーム、C O X 酵素 (C O X - 1 および C O X - 2) があり、これらは、約 6 0 % の配列相同性を有するが発現プロファイルおよび機能において異なる。C O X - 1 は、酵素の構成的形態であり、これは、正常な生理学的機能、例えば血小板凝集、胃における細胞機能の保護、および正常な腎臓機能の維持の調節を助ける生理学的に重要なプロスタグランジンの生産に関連する。(D a n n h a r d t a n d K i e f e r (2 0 0 1) E u r . J . M e d . C h e m 10 . 3 6 : 1 0 9 - 2 6) 。第二のアイソフォーム、C O X - 2 は、炎症性サイトカイン、例えばインターロイキン - 1 (I L - 1) やその他の成長因子により誘導される酵素の形態である。(H e r s c h m a n n (1 9 9 4) C a n c e r M e t a s t a s i s R e v . 1 3 4 : 2 4 1 - 5 6 ; X i e e t a l . (1 9 9 2) D r u g D e v . R e s . 2 5 : 2 4 9 - 6 5) 。このアイソフォームは、アラキドン酸 (A A) からのプロスタグランジン E 2 (P G E 2) 生成を触媒する。C O X - 2 の阻害は、通常の N S A I D S の抗炎症性の活動を引き起こす。

【 0 0 1 8 】

リウマチ様関節炎は、主として自己免疫疾患であり、変形性関節症は、関節における軟骨の分解により発症するが、それぞれに関連する炎症を減少させることによってこのような病気に罹った人々の生活水準をかなり高められる。(W i e n b e r g (2 0 0 1) I m m u n o l . R e s . 2 2 : 3 1 9 - 4 1 ; W o l l h i e m (2 0 0 0) C u r r . O p i n . R h e u m . 1 3 : 1 9 3 - 2 0 1) 。リウマチ様関節炎に加えて、炎症は、一般的に、リウマチ病の構成要素である。それゆえに、例えば全身性エリテマトーデス (S L E) のような病気 (G o e b e l e t a l . (1 9 9 9) C h e m . R e s . T o x . 1 2 : 4 8 8 - 5 0 0 ; P a t r o n o e t a l . (1 9 8 5) J . C l i n . I n v e s t . 7 6 : 1 0 1 1 - 1 0 1 8) 、同様に、強皮症のようなリウマチ性の皮膚状態に対する C O X 阻害剤の使用が広がっている。C O X 阻害剤はまた、リウマチ由来ではない炎症性の皮膚状態 (例えば乾癬) の軽減に用いられ、この場合、プロスタグランジンの過剰生産による炎症を軽減することにより直接的な利益が提供される。(F o g h e t a l . (1 9 9 3) A c t a D e r m V e n e r o l o g i c a 7 3 : 1 9 1 - 3) 。簡単に言えば、C O X 阻害剤は、慢性炎症性疾患の症状、同様に、一過性の炎症による不定期の疼痛や痛みの治療に有用である。

【 0 0 1 9 】

発明の要約

本発明は、概して、新規の生物活性治療剤、栄養補助食品および化粧用剤の発見および開発のための、P h y t o l o g i x ^{T M} と呼ばれる技術基盤に関する。本発明は、生物資源調査およびインフォマティクス、パラレルおよび予備精製技術、オンライン (H T P / U V / M S) およびオフライン (H P L C / P D A / M S) デレブリケーション、ハイスループット生物学的試験技術、コンピューター化データベース検索方法、ならびに、医薬、栄養補助食品および化粧分野における製品開発に対する通常のアプローチにおいて詳細を提供する。新規の治療剤、栄養補助食品および化粧用剤を発見し開発する方法は：(a) 生物学的サンプルを同定し、収集する工程；(b) 2種の溶媒系抽出法を用いてサンプルを抽出する工程；(c) 2種の別々のハイスループット (H T P) 分画法を用いて抽出物を分離し、同時に、各 H T P 分画の活性を決定する工程；(d) 活性な分画をデレブリケーションし、化合物の存在を同定する工程；および (e) 工程 (d) からの各新規の化合物に関する指標、薬理学的および安全性プロファイルを得る工程、を含む。サンプルは、天然の源のいずれからでも選択することができ、該天然の源としては、これらに限定されないが、植物、微生物、菌類、鉱物、海洋、動物およびヒト起源の材料が挙げられる。好ましい実施形態において、サンプルは植物である。加えて、好ましい実施形態において

、サンプルは、付記された従来の使用または既知の薬用特性に基づき予め選択されている。

【0020】

収集された各サンプルに関して収集フォームが作製される。収集フォームは、サンプルに関する特定の情報を含み、情報としては、これらに限定されないが、ラテン名、分布、収集場所、治療に関する情報、従来の調合、植物の同定、および、公開された参考文献が挙げられる。次に、この情報は、データベースに送られる。この情報および蓄積されたデータにアクセスするための特定のマクロおよび問い合わせが設計される。

【0021】

サンプルが収集された後、少なくとも2種の証拠標本が各サンプルに関して調製され、ここで、前記証拠標本は、自然に、および/または化学的に乾燥および/または保存された、十分な再生器官を含むサンプル全体を含み、同定目的のために分類学フォームが各証拠標本に添付される。証拠標本は重要であり、プロセスのリサーチ段階におけるサンプルの完全性および確実性を保証し、プロセスの製造段階における再収集および製造がうまくいく可能性を確実にするために独特のものである。

10

【0022】

PhytoloxTM プロセスの第二および第三の工程は、ハイスループット法を用いた多様な粗抽出物および分画ライブラリーの作製を可能にする複数の標準化した抽出および分画化プロトコルを含む。工程(b)の溶媒抽出法は：(a)適切な量のサンプルを摩砕する工程；(b)2種の有機溶媒の組み合わせを用いて摩砕したサンプルを抽出する工程（前記組み合わせは、低極性溶媒と、高極性溶媒とからなる）；(c)有機抽出後にサンプルを乾燥させる工程；(d)乾燥したサンプルを水性溶媒で抽出する工程；および(e)両方の抽出液から溶媒を蒸発させ、抽出物を単離する工程、を含む。抽出されたサンプルの量は、一般的に1g~1000gである。

20

【0023】

有機抽出工程で用いられる低極性は、6~10個の炭素を有するアルカン、1~4個の炭素原子を有するハロゲン化アルカン（各炭素原子は、1~4個のハロゲン原子を含む）、式R'COOR''で示されるエステル（式中、R'は、1~6個の炭素を有するアルキル基から選択され、R''は、1~8個の炭素を有するアルキル基から選択される）、および、3~12個の炭素を有するケトンからなる群より選択される。低極性溶媒は、塩化メチレン、酢酸エチルおよびクロロホルムからなる群より選択される。高極性溶媒は、DMSO、THFおよびアルコールからなる群より選択され、ここで、前記アルコールは1~8個の炭素を有する。好ましい実施形態において、アルコールは、メタノール、エタノール、プロパノールおよびブタノールからなる群より選択される。水性溶媒は、これらに限定されないが、水、酸水溶液、塩基水溶液、または、水性緩衝液からなる群より選択され、pHは1~14に調節される。抽出は、当業界既知の抽出法のいずれを用いても行うことができ、例えば、これらに限定されないが、振盪、音波破碎、還流、攪拌および加圧混合、ならびに、ろ過が挙げられる。

30

【0024】

抽出プロセスで得られた抽出物は、生物学的試験のために、(a)有機抽出物の重量を測り、溶媒に溶解すること；(b)水性抽出物の重量を測り、溶媒に溶解すること；および(c)各抽出溶液をサンプルマスタープレートの個々のセルに移すことにより調製される。有機および水性抽出物を溶解させるための溶媒は、独立して、これらに限定されないが、DMSO、DMF、THF、3~10個の炭素を有するケトン類、および、1~5個の炭素を有するアルコール類などの溶媒からなる群より選択される。

40

【0025】

次に、得られた抽出物は、パラレルクロマトグラフィシステムまたはハイスループット精製(HTP)システムを用いて別々に分画化され、該分画化は、(a)有機抽出物を順相プレパックカラムで分離する工程；(b)水性抽出物を逆相プレパックカラムで分離する工程；(c)検出器で溶出液を検出する工程；(d)分画を収集する工程；および(e)

50

）溶媒を蒸発させる工程を含む方法によりなされる。クロマトグラフィー／H T Pは、周囲圧力、低圧、中間圧、または高圧の溶媒圧力で、周囲温度または20～80の温度で行われる。順相カラムは、シリカゲル、アルミナ、およびアミノプロピル、シアノプロピル、ジオルフロリジルまたはポリアミド、イオン交換樹脂からなる群より選択された樹脂で充填される。逆相カラムは、C - 2、C - 4、C - 8、C - 18、L H - 20、X A D - 4、X A D - 16、およびポリスチレン - ジビニルベンゼンがベースの樹脂からなる群より選択される樹脂で充填される。各クロマトグラフィーカラムにおける樹脂の粒度は、10～200 μmであり、クロマトグラフィーカラムは、サンプルの量および分離の困難さに応じて、1～500 gの樹脂で充填される。

【0026】

順相クロマトグラフィーカラムは、6～10個の炭素を有するアルカン、式 R^1COOR^2 で示される有機エステル（式中、 R^1 は、1～5個の炭素を有するアルキル基から選択され、 R^2 は、1～6個の炭素を有するアルキル基から選択される）、および式 R^3OH で示されるアルコール（式中、 R^3 は、1～6個の炭素を有するアルキル基である）から選択された3種の有機溶媒の組み合わせで溶出される。逆相クロマトグラフィーカラムは、2種の溶媒の組み合わせで溶出させ、該2種の溶媒の組み合わせとしては、脱イオン（D I）水と、1～4個の炭素を有するアルコール、アセトニトリル、T H F、または3～12個の炭素を有するケトンからなる群より選択された溶媒との組み合わせが挙げられる。

【0027】

検出器は、このような目的のために当業界で用いられるどのような検出器でもよく、検出器としては、これらに限定されないが、紫外線（U V）／可視光検出器、マススペクトロメーター（M S）検出器、核磁気共鳴（N M R）検出器、反射インデックス（R I）検出器、または、光散乱検出器（L S D）が挙げられる。紫外線（U V）／可視光検出器は、100～1000 nmの単波長、連続波長または広帯域波長を用いたシングルまたはデュアルチャンネルを含み得る。M S検出器は、エレクトロスプレーイオン化またはソニックスプレーイオン化チャンバー；イオントラップ、または、ポジティブまたはネガティブモードを備えるシングルもしくはトリプル四重極質量検出で構成され得る。N M R検出器は、プロトンまたは炭素プローブで構成され得る。

【0028】

H T P分画化の後、各分画を生物活性に関して試験する。好ましい実施形態において、生物学的試験は、H T P分画化と同時に行われる。生物学的試験のための個々の分画を調製する方法は：（a）有機抽出物からの分画を溶媒に溶解させる工程；（b）水性抽出物からの分画を溶媒に溶解させる工程；および（c）分画溶液をサンプルプレートに移す工程、を含む。有機抽出物および水性抽出物から得られた分画を溶解させるための溶媒は、独立して、これらに限定されないが、D M S O、D M F、T H P、3～10個の炭素を含むケトン、1～5個の炭素を含むアルコール、および、2～3種の溶媒の組み合わせからなる群より選択される。次に、一次スクリーニング法として標準的な生化学的（酵素的）、機能的または生物学的なモデルを用いて、特定の活性を有する抽出物および化合物を同定するために、各分画を分析する。

【0029】

活性な植物抽出物および／または分画、および／または化合物が、作用機序および／または特定の治療的価値を有するものとして同定されれば、化学組成物のプロファイリングおよび活性成分の標準化が行われる。従って、一度同定された活性な分画はデレプリケーションプロセスを受けるが、デレプリケーションプロセスは：（a）サンプルに関する活性データを収集する工程；（b）サンプルに関する物理的特性、分光データおよび構造データを収集する工程；（c）収集されたデータを分析する工程；（d）サンプルの特性に関して商業的データベースを検索する工程；および（e）活性な分画の組成に関して結論を得る工程、を含む。

【0030】

サンプルの活性は、標準的な手段を用いて測定され、該手段としては、これらに限定され

10

20

30

40

50

ないが、酵素阻害、受容体結合、遺伝子発現、細胞の機能調節、タンパク質生産、動物の機能調節、および、動物の病気モデルの操作およびその他の生物学的な機能の測定が挙げられる。活性データは、抽出物、抽出物の分画、精製化合物、半合成および合成化合物から収集することができる。デレプリケーションプロセスで収集された物理的特性データとしては、ただしこれらに限定されないが、UV/VISの吸収または変化に基づくクロマトグラムの保持時間、屈折率、レーザー光散乱パターン、溶媒溶出量、質量、pH、溶解性およびlog Pが挙げられる。

【0031】

収集された分光情報としては、ただしこれらに限定されないが、UV/VISスペクトル、マスペクトル（分子イオンおよびフラグメンテーションイオンを含む）、NMRスペクトルおよび光散乱スペクトルが挙げられる。構造情報は、ドーター/グランドドーターイオンのマスマスマスペクトルパターンおよびマスマスペクトル；一次元および二次元核磁気共鳴分光データからの、プロトン、炭素、リンおよびその他の元素のケミカルシフト；赤外線スペクトルおよびUV吸収スペクトルなどのデータから得られる。データ収集プロセスは、オンライン法（溶出液の一部を指定された検出器に分配することによる）、および/または、オフライン法（HPLC分離から収集した後に個々のサンプルを分析することによる）が可能である。次に、収集されたデータを様々なデータベースを用いて分析する。使用可能な商業的データベースとしては、ただしこれらに限定されないが、Dictionary of Natural Products、ケミカルアブストラクトサービスのレジストレーションファイル、NAPROLERT、MEDLINE、NERAC, DERE P、および、Bioactive Natural Product Databaseが挙げられる。

10

20

【0032】

このプロセスにより、各分画における組成物がデレプリケーションされる。組成物が新規であると決定された場合、各新規の天然産物に関する指標、薬理的および安全性プロフィールを作製するためにさらなる研究が行われる。これらの結果がポジティブである場合、次に、その化合物は、市販可能な製品に開発される。

【0033】

前述の一般的な説明と、それに続く詳細な説明とはいずれも、単に典型および説明であって、特許請求された本発明を制限するものではないことが理解される。

30

【0034】

発明の詳細な説明

本明細書において、本発明の観点に言及するための様々な用語が用いられる。本発明の構成要素に関する記載の説明を補助するために、以下の定義が提供される。

【0035】

本明細書で用いられる「サンプル」は、植物、微生物、菌類、鉱物、海洋、動物またはヒト起源の材料からなる群より選択された生物学的材料または天然材料を意味する。本発明の好ましい実施形態において、サンプルは薬用植物である。用語「標本」および「バイオマス」は、用語「サンプル」と交換可能に用いられる。好ましい実施形態において、サンプルは植物である。

40

【0036】

本明細書で用いられる「栄養補助食品 (nutraceutical)」は、「Dietary Supplement Health and Education Act of 1994 (DSHEA)」で定義されており、ヒト、同様にその他の動物を標的とした産業または市場を標的とした物質の組成物を意味する。

【0037】

本明細書で用いられる「化粧用の (cosmetic)」は、ヒトおよびその他の動物の正常な機能や外観の予防、治療および維持、ならびに、皮膚、髪、形状、およびその他の物理的な外観の完全性を標的とした産業または市場に向けられた物質の組成物を意味する。

50

【0038】

「天然産物」は、天然資源中に存在する元素、化合物、二次代謝産物または構造的成分を意味する。天然産物は、単一の化合物または複数の化合物の混合物であり得る。

「天然材料」は、天然資源から直接得られた原材料を意味する。植物全体または植物の部分、動物、海洋材料、微生物発酵バッチ、土壌サンプル、鉱物材料片などのいずれかが可能である。

【0039】

「抽出」は、溶媒、超臨界流体を用いて、蒸溜、加圧、または昇華プロセスにより天然材料から天然産物を単離するのに用いられるプロセスを意味する。抽出プロセスの生産品は、「抽出物」と呼ばれる。既知の抽出法のいずれでも本発明の方法と共に用いることができる。

10

【0040】

「分画化 (fractionation)」は、抽出物を、複数の部分に分けるプロセス、または、天然産物単独または天然産物の混合物を含む分画に分けるプロセスを意味する。

【0041】

「デレプリケーション」は、国内および商業的データベースを用いて情報を比較するため；および、新規のおよび/または既知化合物の存在に関して結論を得るために、物理情報、分光情報および構造情報に関して、天然産物の単離を行わないで分画または抽出物を分析するプロセスを意味する。デレプリケーションは、さらなる調査をどのように方向付けるかを決定するのに用いられる。

20

【0042】

「活性物質」および/または「生物学的に活性な物質」および/または「生理活性因子」は、天然産物の生物学的な機能を意味する。生物活性の例としては、ただしこれらに限定されないが、酵素阻害、受容体結合、遺伝子発現に対する影響、細胞の機能調節、タンパク質生産の変化、動物の機能調節、および、動物の病気モデルの操作、同様に、生物学的な生産品のその他の測定における効果が挙げられる。

【0043】

「関係データベース」は、データを蓄積し検索する、情報を加工し提示する、および、繰り返しのタスクを自動化するコンピューター化データ管理システムを意味する。

30

「マクロ」は、コンピューターソフトウェアコードを意味し、例えば、データベースに特定のタスクまたは一連のタスクを自動化するために指定されたアクションを実行させることができる「Visual Basic」または「VBALanguage」がある。

【0044】

「問い合わせ (query)」は、データベース中の表に蓄積された情報に関する関係データベースに送られた質問または問い合わせを意味する。特別に設計された問い合わせにより、特定の表からデータを選択し、データを分類しフィルターにかけ、計算を行い、表、フォーム、グラフおよびレポートを作製することが可能である。

【0045】

「濃度」は、所定量の溶媒中の抽出物、分画または天然産物の量を意味する。抽出物プレートは抽出物と類似した濃度で調製され、分画プレートは、各セルで様々な濃度（その物理的特性およびカラムでの挙動に基づき天然産物の通常の分布を反映させる）で調製される。デレプリケーションプロセスで明らかになった生物学的なプロファイルと適合する濃度ピークは、生物活性成分を同定するための重要な情報である。天然産物の濃度は、生物学的試験またはスクリーニングモデルの感度および特性に基づき調節されなければならない。

40

【0046】

「生物学的試験」または「生物学的なスクリーニング」は、インビトロおよび/またはインビボでの生物学的、生化学またはゲノムの機能モデル、および、天然産物の効果を測定する試験プロセスを意味する。

50

【0047】

「ハイスルーブット精製」または「パラレルクロマトグラフィー」は、一式の複数のカラム分離を実行し、それと同時に他の一式のカラムを洗浄および平衡化するように設計された方法を意味する。このプロセスは、コンピューターソフトウェアで制御された器具で実行される。

【0048】

「プレバックカラム」は、同じタイプ、量、樹脂の粒度を用いた標準化した充填プロトコールに基づき、同じサイズおよび直径のカラムに調製されたカラムを意味する。これは、国内で充填してもよいし、または、市販品を購入してもよい。

【0049】

「クロマトグラム」は、溶出液を特定の検出器を通過させることにより検出され引き出された溶出液成分の、UV/VIS吸収、イオン化強度、核磁気共鳴シグナル、光散乱能力、反射インデックスおよびその他の物理的特性に基づく、クロマトグラフ溶出液の図解を意味する。

10

【0050】

「新規の化合物」は、未知の化学構造および組成物；および/または新規の生物活性/機能を有する既知の化学構造を有する天然産物を意味する。

「既知化合物」は、認識された生物活性/機能を有する公開された化学組成物/構造を有する天然産物を意味する。

【0051】

「商業的データベース」は、予約金を支払いアクセスすることができるサービスおよび/または情報管理システムを意味する。このようなデータベースとしては、ただしこれらに限定されないが、NERAC、DIODOLOG、Dictionary of Natural Products、ケミカルアブストラクトサービスのレジストレーションファイル、NAPROLERT、MEDLINE、DEREP、およびBioactive Natural Product Databaseが挙げられる。

20

【0052】

本明細書で用いられる「治療」は、治療および/または予防を含む。用いられる場合、治療は、ヒト、同様にその他の動物に言及する。

「医薬または治療プロフィール」は、有効量範囲内で顕著な毒性を示さない、生物学的システム、生化学的材料および遺伝子標的の活性および機能を調節するの能力を意味する。

30

【0053】

「製薬上または治療上の有効量または量」は、望ましい生物学的な結果を誘導するのに十分な投与量レベルを意味する。その結果とは、薬剤の運搬、病気の兆候、症状もしくは原因の緩和、または、生物学的システムのその他のいかなる望ましい改変であり得る。

【0054】

「宿主」は、本明細書で説明された組成物が投与される生きた検体、ヒトまたは動物である。

「安全性プロフィール」は、活性な栄養補助食品および/または化粧用剤が、相当量で投与された後、生物学的システム、生化学的材料、および分子生物学的な標的の正常な活性および機能を維持させるレベルを意味する。

40

【0055】

「標準化した抽出物」は、定義された量の、個々のおよび/またはトータルの活性天然産物を有する特定の成分プロフィールまたはフィンガープリント化合物を含む、製造プロセスから得られた抽出物を意味する。

【0056】

「候補産物」は、望ましい生物活性および安全性プロフィールを有し、栄養補助食品および/または化粧品産業における市販成分として適切な標準化した抽出物/分画/天然産物を意味する。

【0057】

50

「プロトタイプ製品」は、化学プロフィールの明細および指定されたバイオマスからの活性物質濃度に基づき、製造規模で作製された試験産物を意味する。

「臨床評価」は、特別に設計された、かつ予め承認された臨床試験プロトコールに基づく、天然産物のヒトにおける有効性、安全性、副作用、および禁忌の研究を意味する。

【0058】

本願を通して様々な引用がなされていることを特筆する。各引用は、その全体を参照により本願に加入させる。

PhytologixTM 発見プロセスは、最も一般的には、新規の治療剤、栄養補助食品および化粧用剤を発見し開発するための包括的な方法と説明することができ、該方法は：(a) 予め定義された生物学的サンプル同定し、収集する工程；(b) 2種の溶媒系抽出法を用いて生物学的サンプルを抽出する工程；(c) 2種の別々のハイスループット（HTP）分画法を用いて抽出物を分離し、同時に、各HTP分画の活性を決定する工程；(d) 活性な分画をデレプリケーションし、化合物の存在を同定する工程；および(e) 工程(d)からの各新規の化合物に関する指標、薬理学的および安全性プロフィールを得る工程、を含む。収集しようとするサンプルの予備選択は、従来の使用に基づく。

10

【0059】

PhytologixTM 発見プログラムが成功したことを確かめるために、全世界から薬用植物およびその他の生物サンプルを収集することが必須であった。それゆえに、生物学的多様性に関する協定の国連条約に従って、PhytologixTM プログラムは、アジア、南アメリカ、北アメリカ、アフリカおよびその他の地質学的領域の国々を含む8の国際的な民族学的植物の収集の同意を打ち立てた。ランダム化した植物収集プログラムと対照的に、PhytologixTM は、付記された薬用植物およびその他の付記されたバイオマテリアルに焦点を当てる。数千年の歴史的な使用により、これら薬用植物およびその他のバイオマテリアルは、すでに予備選択されており、ヒトの摂取に関して臨床的に試験されている。従って、ランダム化したバイオマテリアル収集と対照的に、これらにより、安全で有効な医薬、栄養補助食品および化粧用製品を得る可能性が最も高い。歴史的な使用に関して利用可能な情報により、薬用植物およびその他のバイオマテリアルに関する現代的なリサーチで提供される利用可能な情報と組み合わせ、可能性のある臨床的な指標、同様に予想される作用機序に関して相当量の証拠が提供される。この情報はまた、利用可能な民族学的薬用情報に基づくスクリーニングモデルを確立することにおいても役立つ。PhytologixTM 発見のための、植物およびその他の天然のバイオマテリアルの従来の使用に基づく予備選択は、本発明に特徴的であり、高いポジティブヒット率、安全な産物および短い発見サイクルを確実にするのに重要である。好ましい実施形態において、サンプルは薬用植物である。

20

30

【0060】

全てのサンプル収集は、実施例1で説明したような標準化した収集および証拠標本調製方法を用いて行われた。好ましい実施形態において、1g～10,000gのサンプルが収集される。収集された各サンプルに関して標準化した植物/サンプル収集フォームに記入し、実施例2および図2で説明したような検索可能なインフォマティクスデータベース情報を送った。一実施形態において、本発明は、特徴的なバイオマス登録システムを開示し、該システムは、独占的なコードを収集された各サンプルに対して与えることを伴う。指定されたコードは、実施例1で説明したようなバイオマスの天然の起源に直接的に関係し、インフォマティクスデータベース中の全ての情報と一緒にリンクするための一次的なキーとして用いることができる。

40

【0061】

本発明の他の実施形態は、収集された各サンプルに関して2種の証拠標本を作製することを含む。分類学フォームが同定目的のために各証拠標本に添付される。分類学フォームは、サンプル同定、サンプル収集、および、コレクター名などに関する情報を含む。このような試みは、プロセスのリサーチ段階の際のバイオマスの完全性および確実性を保証するために、および、本発明の製造段階の際に再収集および製造がうまくいく可能性を確実に

50

するために、重要かつ特徴的である。実施例 1 で示すように、これまで、PhytologixTM 収集プロセスにより、1,170 種の薬用植物およびその他の天然材料が入手された。実施例 1 で説明したように得られた 2 セットの証拠標本が各サンプルで作製された。加えて、バイオマスあたり 500 ~ 2,000 g の乾燥材料が貯蔵された。この標本の収集は、全世界から収集された 266 種のファミリー、805 種の属、および、932 種の異なる種を含む。

【0062】

本発明は、新規の薬用植物ライブラリーのバイオインフォマティクスが推進する評価を含む。現在の千種を超える収集、ならびに、10,000 種を超える薬用植物およびその他の世界中からの生物学的な標本に対する可能性のあるアクセスと共に、PhytologixTM 発見プログラムは、民族学的指標および植物化学（これらに限定されないが）などの情報からなる関係データベースを含む。このデータベースにより、従来の使用に基づき最も可能性を有する薬用植物のスクリーニングを優先的に行うことを可能にする。この例は、表 1 で示され、関節炎痛のための新規の栄養補助食品製品の発見および開発の目標を説明する目的で用いられている。これを行うために、キーワードとして「関節炎」を用いてインフォマティックデータベースの検索を行う。検索結果により、関節炎痛の治療に伝統的に用いられてきた 18 種の植物の列挙された（表 1）。それゆえに、全ての植物のランダム化したスクリーニングとは対照的に、該発見プロセスは、これら 18 種の植物の評価に焦点を当てることができる。この方法は、ランダム化したスクリーニング（スクリーニング法は伝統的に動物モデルを用いたため、限られた数のサンプルしかスクリーニングすることができない）に比べて、顕著な利点を提供する。しかしながら、ランダム化したスクリーニングは、本発明の方法に従って排除されない。本発明の方法はまた、作用機序、同様に従来の使用に基づくハイスループットスクリーニング方法論にも及ぶ。本発明はまた、標準化した抽出物および 96 ディープ・ウェルプレートでの HTP 分画を提供することにより、ランダムスクリーニングを選択することもできる。

【0063】

PhytologixTM 発見プロセスは、複数の標準化した抽出および分画化プロトコールに依存し、限られたコストでハイスループットフォーマットにおける多様な抽出物および分画化ライブラリーを作製することができる。PhytologixTM プログラムにおいて収集された全てのバイオマスは、実施例 3 で説明されるような標準化した抽出プロトコールに従って加工された。この抽出法は、これまで説明されていた抽出法論に比べた場合にいくつかの利点を提供する。まず第一に、本明細書で説明されるデュアル抽出法により、各バイオマスからさらにより完全に広範な天然産物プロフィールが得られる。このプロセスを用いれば、重要なタイプの天然産物の漏れは全くおこらない。

【0064】

実施例 3 で説明したように、サンプル（好ましくは 1 g ~ 1000 g）が、中極性溶媒の組み合わせ（例えば 1 : 1 の割合の塩化メチレン : メタノール）で初めに抽出される。低極性溶媒の組み合わせ、例えば塩化メチレンと高極性溶媒（例えばメタノール）とを組み合わせることにより、低極性から中極性化合物、例えばテルペノイド、アルカロイド、脂肪酸、フラボノイド、ステロイド、リグナン、ベンゾフェノン、クロモン、およびアントラキノン（複数の極性官能基および/またはモノ、ジおよびトリグリコシドを含む）を溶解させる溶媒系が得られる。低極性溶媒は、抽出を行うために当業界で用いられる全ての既知の低極性溶媒から選択することができる。好ましい実施形態において、低極性溶媒は、6 ~ 10 個の炭素を有するアルカン、1 ~ 4 個の炭素原子を有するハロゲン化アルカン（各炭素原子は、1 ~ 4 個のハロゲン原子を含む）、式 R'COOR'' で示されるエステル（式中、R' は、1 ~ 6 個の炭素を有するアルキル基から選択され、R'' は、1 ~ 8 個の炭素を有するアルキル基から選択される）、および、3 ~ 12 個の炭素を有するケトンからなる群より選択される。低極性溶媒の例としては、ただしこれらに限定されない

10

20

30

40

50

が、塩化メチレン、酢酸エチルおよびクロロホルムが挙げられる。極性溶媒はまた、抽出を行うために当業界で用いられる全ての既知の極性溶媒から選択することができる。好ましい実施形態において、極性溶媒は、これらに限定されないが、DMSO、THFおよび1~8個の炭素を有するアルコールからなる群より選択される。アルコールの例としては、ただしこれらに限定されないが、メタノール、エタノール、プロパノール、および、ブタノールが挙げられる。水溶性のより高い極性の成分、例えば第四イオン化アルカロイド、オリゴ糖、多糖類、有機酸塩、フェノール性塩、アントロシアニジン (anthrocyanidins)、アミノ酸、ペプチド、タンニン、鉱物およびその他の無機化合物は、水、酸水溶液、塩基水溶液、または水性緩衝液でのみ抽出される。それゆえに、デュアル有機溶媒系を用いた抽出に続いて、バイオマスは、バイオマスに含まれる水溶性成分を溶解させるために、水、酸水溶液、塩基水溶液、または水性緩衝液で抽出される。好ましい実施形態において、両方の抽出で用いられる溶媒の量は、抽出されたサンプルの重量の1~10倍の割合である。抽出は、既知の抽出方法のいずれかを用いて行うことが可能であり、該方法としては、これらに限定されないが、振盪、音波破碎、還流、攪拌および加圧混合、ならびに、ろ過が挙げられる。様々な植物種で行われた代表的な有機および水性抽出物を表2に示す。

10

【0065】

本明細書で説明された抽出法論の効率は、実施例4で説明される。実施例3で説明された有機および水性抽出の後、メタノールでさらにバイオマスを抽出することにより、ほんの少量の抽出可能な材料が得られ(表3)、これはまったく同じHPLCクロマトグラムを示す(図5および6)。図5および6で示されたHPLCクロマトグラムは、2種の異なる検出法 - フォトダイオードアレイ(図5)およびイオントラップマススペクトロメーター(図6)を用いて作製された。図5および6で見られるように、いずれの検出方法を用いても、メタノール抽出物中に特定のピークは存在せず、有機抽出物または水性抽出物のいずれにおいても存在しなかった。

20

【0066】

本明細書で説明された抽出法論の他の利点は、抽出プロセスにより、さらなる分画化および生物学的試験には十分な材料が得られることである。例えば、60gのバイオマスの抽出から、約1~8gの有機抽出物、および、1~6gの水溶性抽出物が得られる。これらの量は、多数のスクリーニングおよびHTP分画化に十分な材料が提供する。

30

【0067】

本発明の一実施形態において、ハイスループット分析のための抽出物ライブラリーを調製する新規の方法が説明される。この方法は、有機および水性抽出物をDMSOおよび脱イオン(DI)水に、それぞれ濃度0.01mg~1000mg/mL溶媒で溶解させることにより、一連の抽出物マスタープレート調製することを含む。好ましい実施形態において、抽出物濃度は、50mg/mL溶媒である。サンプルマスタープレートは、これらに限定されないが、96、192、384、576、768、960、1152、1344または1536ウェルプレートからなる群より選択される。好ましい実施形態において、96ディープ-ウェルプレート(プレートあたり88個のサンプルを含む)に溶液を保存した。次に、抽出物を定量で分配し、ハイスループットモデルでスクリーニングすることができる。50~100の典型的なハイスループットスクリーニングを完了するのに十分な材料が各セルに存在する。有機および水性抽出物を溶解させるのに用いることができるその他の溶媒としては、ただしこれらに限定されないが、DMSO、DMF、THF、3~10個の炭素を有するケトン類、および、1~5個の炭素を有するアルコール類が挙げられる。

40

【0068】

本明細書で開示された重要な発見は、抽出物のクロマトグラフィーまたはハイスループット分画化(これらはいずれも効率的かつ経済的に健全である)のための新規の方法である。この方法は、実施例5および6で説明される。抽出物のハイスループット分画方法は:(a)パラレルクロマトグラフィーシステムまたはハイスループット精製(HTP)シス

50

テムを用いる工程；(b)有機抽出物を順相プレバックカラムで分離する工程；(c)水性抽出物を逆相プレバックカラムで分離する工程；(d)溶出液を検出器で検出する工程；(e)分画を収集する工程；および(f)溶媒を蒸発させる工程、を含む。好ましい実施形態において、クロマトグラフィシステムは、2～4個の溶媒吐出ポンプ、溶媒ミキサー、および適切な自動ライン切り替え器を含む。クロマトグラフィは、周囲圧力、低圧、中間圧、または高圧の溶媒圧力で、周囲温度または20～80の温度で行われる。順相カラムは、これらに限定されないが、シリカゲル、アルミナ、およびアミノプロピル、シアノプロピル、ジオルフロリジルまたはポリアミド、イオン交換基結合樹脂からなる群より選択される樹脂で充填される。逆相カラムは、これらに限定されないが、C-2、C-4、C-8、C-18、LH-20、XAD-4、XAD-16またはポリスチレン-ジビニルベンゼンをベースとした樹脂からなる群より選択される樹脂で充填される。樹脂の粒度は、10～200 μ mである。クロマトグラフィカラムは、1～500gの樹脂で充填される。

10

【0069】

植物抽出物の分画化のための多くの様々な方法が報告されている。このような方法のいくつかはなお、シリカゲルおよび逆相C-18カラムのような本明細書で説明されたのと類似の固相を利用する。しかしながら、発明の背景で前述したように、ほとんどの従来技術法は、段階的勾配を用いるために限られた数の分画(通常、20分画未満)および不完全な分離しか得られず、さらなるクロマトグラフ精製が必要となる。本発明は、3種の有機溶媒の特徴的な組み合わせの勾配を用いて順相カラムでの分離を行う点で従来技術法より優れており、該有機溶媒としては、6～10個の炭素を有するアルカン、 R^1COOR^2 で示されるエステル(R^1 は、1～5個の炭素を有するアルキル基から選択され、 R^2 は、1～6個の炭素を有するアルキル基から選択される)、および R^3OH で示されるアルコール(式中、 R^3 は1～6個の炭素を有するアルキル基である)。図7および8で説明するように、この3種の溶媒系の組み合わせは、分離および各ウェルにおける分画の質を顕著に改善する。本発明で実証したように、有機(実施例5)および/または水性抽出物(実施例6)から、シングルカラムを用いて天然産物を精製することができる。その上、産物は、限られた数のセル/分画(通常は2～8個のセルに)に分配される。逆相カラムでの分離は、2種の溶媒の組み合わせで行われ、例えば、DI水と、1～4個の炭素を有するアルコール、アセトニトリル、THF、または3～12個の炭素を有するケトンからなる群より選択された溶媒との組み合わせである。

20

30

【0070】

しかしながら、いくつかの既知の方法が、勾配能およびより優れた分離能力を有するHPLCシステムを用いており、カラムにローディングできる量の材料および分画化のスループットは、本発明とは比較にならない。実施例5および6で説明されたように、有機および水性抽出物は、市販のプレバックカラムにローディングすることができ、一般的に、有機抽出にはシリカゲルカラム、および、水性抽出にはC-18カラムを100mg～2000mgの量で用いられる。このような量でのハイスループット精製で得られた各分画は、濃度1～10mg/mLで溶液に溶解させることができる材料を数ミリグラム含み得る。従って、本発明は、天然産物リサーチにおける2つの主要な問題を解決するが、その一つは、活性はわずかだが新規の化合物が生物学的試験の検出限界またはポジティブの閾値を下回ってしまう誤ったネガティブ結果をどのように防ぐか、という問題である。もう一方の解決された問題は、望ましい生物学的な効力より低い効力を有する複数の化合物の混合物からの相乗効果に起因する誤ったポジティブをどのように除去するか、である。本明細書で開示された方法は、粗抽出物中に存在する個々の成分を分離するだけでなく、植物抽出物中の低活性の成分を顕著に高め、それにより、これら少ない成分がスクリーニングプロセスで検出される機会をより大きくする。

40

【0071】

検出器は、このような目的のために当業界で用いられるいずれの検出器でもよく、これらに限定されないが、紫外線(UV)/可視光検出器、マススペクトロメーター(MS)検

50

出器、核磁気共鳴 (N M R) 検出器、反射インデックス (R I) 検出器、または、光散乱検出器 (L S D) が挙げられる。紫外線 (U V) / 可視光検出器は、100 ~ 1000 nm の単波長、連続波長または広帯域波長を用いたシングルまたはデュアルチャンネルを含み得る。MS 検出器は、エレクトロスプレーイオン化、ソニックスプレーイオン化、または、化学イオン化チャンバー；イオントラップ、または、ポジティブまたはネガティブモードを備えるシングルまたはトリプル四重極質量検出で構成されてもよい。N M R 検出器は、プロトンまたは炭素プローブで構成されてもよい。

【0072】

本発明のその他の特徴は、オンライン構造情報収集である。本発明は、パラレルプロセッシングモードにおける高圧クロマトグラフィシステム、すなわちロボット制御の液体操作システムに組み込まれた複数の同時のカラム稼働を利用し、これを作動させて、クロマトグラフ溶出液 (個々の化合物を含む) を、予めプログラムされた時間または容量、または、化学反応パターン、好ましくは紫外光吸収スペクトルもしくはイオン化パターンに基づき遂行する。このパターンは、コンピューター分析によりパターンのライブラリーと比較した場合、その化合物が既知または未知の化学物質のいずれであるかを決定することができる。図14 ~ 16 は、1つのH T P分画のオンラインマス分光データ、および、同分画のオフライン分析を示す。この方法において、分光データが分離の時に収集されるため、収集された分画を別々のプロセスで分析するよりもずっと効率的である。加えて、該方法は、まさに正確であることが示された。図14 ~ 16 で説明された例において、H T Pシステムにより、サンプルは、液体操作システム (溶出液のアリコートがマイクロタイタープレートに分配された場合)、および、超音波イオン化チャンバーを備えるイオントラップマススペクトロメーター (化合物の分子イオンおよびフラグメンテーションパターンが決定された場合) の両方へ同時に導かれた。マススペクトルから、分画の成分に関する分子量および一般構造情報を得ることが可能である。この情報は、純度と仮の同定を確かめるために、コンピューター分析により化学ライブラリーと比較される。

10

20

【0073】

実施例5および6で示したように、本明細書で開示された方法は、高効率であることが証明される。分画化プロセスのスループットは、1日で、14種の有機抽出物から1232個の分画を、または、32種の水性抽出物からの2618個の分画を得ることができる。このスループットは、発明の背景で述べたいずれの既知の方法よりも10倍高い。

30

【0074】

最後に、本明細書で開示された方法論の重要な利点は、操作のコストが低いことである。消耗品のコストの詳細な分析は、表4および5に示される。有機または水性抽出物から、サンプルの1つの分画を作製するための材料コストは、それぞれたったの16セントおよび32セントである。順相カラムは、1回しか使用できないが、逆相カラムは、各稼働の間に適切な洗浄を行い60回まで再使用することができる。C - 18カラムの実行を、アロエクロモンの既知化合物混合物を用いて厳密にモニターした (データは示さず)。図9で示すように、同じ水性抽出物での12のC - 18カラム分画化を行うことによって、分離が高度に再現可能であることが示された。従来技術では、このように低コストかつハイスループットで、このような高品質の天然産物分画ライブラリーが得られる匹敵する方法はない。

40

【0075】

一旦生物学的なおよび / または指標標的が定義されれば、ハイスループットスクリーニング (H T S) を実行するための P h y t o l o g i x ^{T M} アプローチは、抽出物をスクリーニングする一次的な手段として、生化学 (酵素的な受容体結合分析)、遺伝子発現、機能的または生物学的なモデルを適用することにより達成され、特定の活性を有する抽出物中の化合物を同定することができる。好ましい実施形態において、用いられるモデルとしては、ただしこれらに限定されないが、酵素阻害、受容体結合、遺伝子発現、細胞の機能調節、タンパク質生産、動物生理学的、神経学的および挙動の機能調節、ならびに、動物の病気モデルの操作、ならびに、その他の当業界で既知の生物学的な機能測定が挙げられ

50

る。分画の活性に関するデータは、抽出物、抽出物の分画、精製化合物、半合成および合成化合物から収集することができる。

【0076】

本発明の方法を用いて作製された抽出物ライブラリーの価値を実証するために、実施例7で、酵素的スクリーニング、および、得られた結果を説明する。作用機序がシクロオキシゲナーゼ(COX)酵素の阻害である抗炎症性化合物を同定するために、COX酵素阻害分析を行い、中国、インド、およびその他の国々から収集された615種の薬用植物からの1230種の抽出物を含む抽出物ライブラリーを評価した。これら抽出物を調製するのに用いられる一般的な方法は、実施例3で説明される。抽出プロセスにより、試験された各種に関する有機および水性抽出物が得られた。これら一次抽出物は、酵素のペルオキシダーゼ活性(シクロオキシゲナーゼの主要な機能的活性の一つでありPGG₂をPGH₂に変換し最終的にはPGE₂にすることにより炎症を引き起こす)の阻害剤を同定するための予備分析において用いられる原材料である。この分析は実施例7で説明されており、結果は図10に要約される。図10を参照すると、1230種の植物抽出物をスクリーニングした後、トータルで15種の有機抽出物(1.2%)、および、7種の水性抽出物(0.6%)が、60%を超過する阻害を有し、以下で説明するような別の実験で確認された用量反応を有することを確認した。個々の植物抽出物における代表的な活性測定は、表6に示される。表6を参照すると、2種の*Scutellaria*、および、3種のその他の植物種(これら全て、共通成分として遊離B環フラボノイドを含む)が、一次スクリーニングにおいて、程度は異なるものCOX-2のペルオキシダーゼ活性に対して阻害性を示したことがわかる。COX-2阻害活性は、主として、有機抽出物(ほとんどの中極性の遊離B環フラボノイドを含む)中に発見される。粗抽出物の一次分析からのCOX-2阻害活性は、用量反応およびIC₅₀(50%の酵素活性を阻害するのに必要な濃度)を測定することによって確認された。IC₅₀値は、表7に示される。表7からわかるように、この分析において、*Scutellaria orthocalyx*の根抽出物、および、*Murica nana*の葉抽出物が最も有効であった(IC₅₀ = 6~10 μg/mL)。COX-1に比べてCOX-2に対して最も高い選択性を示した*Scutellaria*種からの抽出物は、*Scutellaria lateriflora*から得られた抽出物であった(COX-2のIC₅₀ : 30 μg/mL ; COX-1のIC₅₀ : 80 μg/mL)。従って、COX酵素の阻害剤に関して一次スクリーニングすることにより、22種の抽出物が同定され、これらはインビトロで有効であり、そのいくつかはCOX-1に比べてCOX-2酵素に特異的であることを示した。

10

20

30

【0077】

実施例8は、化粧品として使用するための新規の皮膚用白色化剤を同定する試みにおいて、酵素チロシナーゼの阻害剤に関して植物抽出物ライブラリーをスクリーニングすることを示す。この分析から、5.6%のヒット率に相当する43種の有機抽出物がチロシナーゼ阻害活性を有すると同定された。これは、774種の植物抽出物のスクリーニングに基づき、水性抽出物に関して0.78%より顕著に高いヒット率を示した。結果は、図11に示される。標的化された指標は、皮膚用白色化剤として用いるための化粧用製品であるため、より低い極性を有する化合物がより優れた皮膚への浸透力を有するはずである。スクリーニング結果により、不要な物理的特性を有する天然産物を抽出と生物学的試験プロセスとの両方の選択性により自動的に除去した抽出物ライブラリーの品質が実証された。

40

【0078】

分画化ライブラリーの直接スクリーニングは、それ自身価値があり、なぜなら、各分画が、共通して粗抽出物が有する問題である誤ったポジティブおよび誤ったネガティブを得る可能性が除去されるのに十分な高い濃度で1つの主要な化合物を含むためである。加えて、少量の生物活性成分が検出される可能性がより高くなり、なぜなら、これら成分は、それらが検出されるのに十分な程濃縮されるためである。実施例9は、実施例7で説明するように単離された生物活性抽出物のスクリーニングを説明する。この実施例において、COX-1およびCOX-2両方のペルオキシダーゼ活性を阻害するその能力に関して各H

50

TP分画を試験した。Camellia sinensisの水性抽出物から得られた分画の代表的なHTP/UVクロマトグラムを、図12に示す。96ウェルプレートからの全ての88個の分画をスクリーニングした後、図13で示すように、トータルで8個のHTP分画が、60%を超過するCOX阻害を示した。実施例11で説明されたデレプリケーションプロセスに続いて、COX活性に寄与する分画と、その分画の前後で、10の別々の化合物が同定された。粗水性抽出物中に分析を邪魔したり効力を覆い隠すような多くの成分が存在する。しかしながら、本発明では、これら成分を他のウェルに析出させた。このプロセスは、粗抽出物中の単一のデータポイントからの、複数の生物活性化合物が同定された8個のポジティブ分画に対するポジティブヒット率を大いに高める。

【0079】

本明細書で開示された方法を用いて作製されたHTP分画ライブラリーの主要な利点の一つは、顕著に改善されたデレプリケーションの効率および正確さである。デレプリケーションは、サンプル中に新規の化合物が存在する可能性を調べるために、活性なサンプルの構造および物理的特性プロフィールを最大限可能な限り同定するに用いられる方法である。新規の化合物が存在する可能性があるという決定は、さらに単離および同定する試みの正当性を示す。この目的を達成するために、国内の構造および分光学的特徴データベースを、代表的な共通の天然産物の構造骨格を有する250種を超える既知の純粋な化合物を用いて開発した。実施例10は、このデータベースを構築するのに用いられた方法を説明する。実施例10で説明したように、これら化合物の分析に用いられたHPLC法は、既知の方法より改善されている。該方法は、より短時間であり（分析あたりトータルで8.5分間）、より小さい粒度のC-18樹脂、より小さい直径を有するが、より長いカラムを用いた結果として分離能力を犠牲にすることがない。目下、この国内のデータベースは、contains それぞれ個々の化合物に関する6のフィールド、すなわち化合物のタイプ、化合物名、分子量、化学構造、UVスペクトルおよび保持時間を含む。表8は、フラボノイド、アルカロイド、コーヒー酸、テルペノイド、クロモン、アントラキノン、イリドイド、アセトフェノン、およびクマリンに関するデータベースにおける代表的な情報を示す。上述した標準化したHPLC法を用いて、勾配溶媒系を用いた逆相および/または順相カラムで活性なサンプルが分離される。PDAおよびMSから検出されたピークは、以下のように分析される：ピークのUVスペクトルは、構造骨格または化合物のタイプ、すなわちフラバン、イソフラボノイド、テルペノイド、コーヒー酸誘導体などに関する国内のスペクトルデータベースおよび国外のデータベースに対して検索される；次に、その他の検索可能なフィールド、例えば植物ラテン名、化合物のタイプ、UVスペクトルと共に、Dictionary of Natural Productsのようなデータベースを用いた分子量を検索させるために、ピークの分子イオンを用いる；および、最後に、極性、log P、溶解性、およびその他の化合物の物理的特性に関する一般概念を得るために、保持時間を用いる。

【0080】

PhytologixTM デレプリケーションプロセスの特徴を、実施例10および11に示す。実施例11は、COXペルオキシダーゼの阻害剤に関して緑茶の水性抽出物から得られたHTP分画ライブラリーデレプリケーションを説明する。図13で示されるCOX阻害ピーク周辺のトータルで24個の分画を標準化したHPLCを用いて分析した。保持時間、UVおよびMSデータを得て評価した後、各24個のセルにおける全ての主成分がデレプリケーションされ、既知のカテキンおよびフラボノイド系の化合物であることが同定された。結果は、図17に示される。各化合物を3~4個の別々のセルに分配した。カテキンおよびフラボノイドのCOX阻害活性はよく知られているため、デレプリケーションプロセスからの結論は、これらの活性な分画は追求する価値がないということである。

【0081】

実施例12は、B16細胞系におけるメラニン形成阻害に関するHTP分画ライブラリーのデレプリケーションの結果を説明する。簡単に言えば、阻害および細胞の生存能力分析

10

20

30

40

50

に続いて、実施例 5 で説明するように、*Mallotus repandus* の植物全体からの活性な有機抽出物を HTP を用いて分画化した。全ての HTP 分画をチロシナーゼ阻害活性に関して試験し、結果を、図 18 に示す。図 18 を参照すると、メラニン合成の > 50% 阻害を示す 3 つの主要なピーク、および、より弱い阻害を示す 7 つのその他のピークが存在する。鋭い活性ピークは、活性成分を 3 ~ 5 個のセルに分配した分離の品質を示す。

【0082】

メラニン形成分析が細胞の生存能力分析に対して行われたため、分画 D11 での最大活性ピークは、細胞毒性による可能性が高い。分画 D2 ~ D7 に存在するその他の活性なピークのデレプリケーションを、図 19 に示す。全ての活性な分画を HPLC で分析した。各分画の HPLC クロマトグラムにおいて $R_t = 16.33$ 分間でピークが存在した。このピークは、これら分画のメラニン阻害活性により示された傾向として、同じ増加 ~ 減少強度を示した。さらなる UV スペクトル分析により、この化合物が没食子酸誘導体であることが明らかになった。分子イオンおよび植物の属名に関する *Dictionary of Natural Products* 検索により、既知化合物であるプテロカリアニン (*Pterocaryanin*) B が同定され、その構造を図 19 H に示す。該構造におけるポリヒドロキシル基は、メラニン合成阻害を引き起こすものである。これが既知化合物であるため、さらなる単離は必要なかった。

10

【0083】

結論として、促進された活性の同定プロセス (デレプリケーションと呼ばれる)、例えば、*Dictionary of Natural Products* およびその他の国外のデータベース (NERAC サービスを介してアクセス可能) の使用と組み合わせられた国内の構造および分光学的データベースにより、高効率かつ迅速な構造同定が提供され、これにより、既知の成分、誤ったポジティブおよび誤ったネガティブを除去することができ、単離を目的とした分析を行うことによって新規の活性天然産物が発見される。本明細書で説明された方法論は、既知の方法に対して顕著な利点を有し、特に精製化合物ライブラリーの開発および使用である。第一に、特徴的な分離条件および一回のクロマトグラフィアプローチを用いるため、*PhytologixTM* HTP 分画ライブラリーは、発明の背景で説明したようなその他の既知のライブラリーに比べて、かなり簡単かつ廉価で作製できる。実証されたように、*PhytologixTM* HTP ライブラリーにおいて、高純度の天然産物を、多数のハイスループット分析を実行するのに十分な量で個々のセルに含む。第二に、*PhytologixTM* 基盤に従ったデレプリケーションプロセスは、生物学的試験結果に厳密に関連する。従って、活性な分画および狭い周囲の分画のみが分析され、これはいずれも時間を節約し、試みに焦点をあてており、従来技術で説明するような全ての分画のデレプリケーションおよび / またはいくつかの分画のランダム化したデレプリケーションとは対照的である。第三に、*PhytologixTM* デレプリケーションは、UV または MS クロマトグラムから得られた活性な分画の天然の重量分布曲線を、生物活性プロフィールと適合させることにより利用し、それにより、活性成分をよりいっそう正確かつ迅速に同定することができる。最後に、*PhytologixTM* プロセスからのより短時間のオフライン HPLC 法およびオンラインデータ収集は、コスト

20

30

40

【0084】

デレプリケーションプロセスから、活性な HTP 分画が新規の化合物または化合物を含むことが決定される場合、実施例 13 で説明されるように、広範な単離、精製および同定プロセスが行われる。この実施例は、COX 酵素活性を阻害する化合物バイカレインの単離、精製および同定を示す。精製された後、純粋な化合物の抗炎症性活性が確認された。結果を、図 20 に示す。

【0085】

活性な植物抽出物および / または分画および / または化合物において新規の作用機序および / または特定の治療的価値を有することが同定されれば、化学組成物のプロファイリン

50

グおよび活性成分の標準化が完了する。化合物の安全性および治療効率の評価および確認は、タンパク質、細胞、遺伝子および動物モデルを用いた二次スクリーニングで達成される。実施例14は、PhytologixTM基盤を用いて同定および開発された標準化した植物抽出物の抗炎症性活性の確認を説明する。結果を、図21に示す。確認プロセスは、インビトロおよびインビボ両方での効能、安全性および毒性に関する情報、生物学的利用可能性および投与量を確率できるように設計された。全体的としてみれば、PhytologixTM発見プロセスは、競争力のある利点を有する新規の成分の市場同定および識別を確立する。

【0086】

PhytologixTM発見プロセスの最後の工程は、知的財産の位置付けのためのバイオインフォマティックデータベース、原料の調達、および、パイロット規模のプロセス最適化により方向付けられた製品開発法である。製造後の製品の医薬活性および安全性/毒物学プロファイリングを再確認することによって、規定承認に関して準備し、顧客に対して規定ガイダンスおよび効果的な要求の具体化を提供することができる。

10

【0087】

実施例15において、栄養補助食品製品として天然のCOX阻害剤を開発することにおいて実際の例を利用する全プロセスが要約される。生産品は、関節痛および炎症を標的とした、UnivestTMと呼ばれる物体の新規の組成物である。この物質の組成物は、2002年3月22日付けで出願された米国特許出願第10/104,477号、表題「Isolation of a Dual COX-2 and 5-Lipoxygenase Inhibitor from Acacia」で説明されており、その全体を参照により本発明に加入させる。この産物は、現在市販されており、図22および23は、販売シートおよびこの産物の分析の証明書を示す。

20

【0088】

PhytologixTMプロセス一般的な要約を、実施例16で示し、図24~27で説明する。図24は、PhytologixTM発見プロセスを図式的に示す。植物収集ライブラリーおよび市場の要求の分析から、優先的な植物抽出物を分析するようにハイスループットスクリーニングモデルを開発した。生物活性を同定した後、標準化した抽出物/濃縮した分画/純粋な化合物に基づき、薬理学的および安全性プロフィールを作製した。このプロセスの生産品が、候補産物である。図25は、PhytologixTM開発プロセスを図式的に示す。図25を参照すると、候補産物、情報検索および製品開発により、製品使用のための植物源が同定され、知的財産の位置付けおよび市場の利点に関する推奨が得られる。製造プロセス開発、および、パイロット規模プロトタイプ製品の製造に続き、効率および安全性プロフィールの確認が行われる。臨床試験がうまくいくことや、最終産物の発売をもって、PhytologixTMプロセスの完了とする。

30

【0089】

図26は、重要なタスクのチェックリストを示し、これは、重要な活性の経過を追い、データ作製を続けるために、PhytologixTMプロセスで利用することが可能である。

【0090】

図27は、PhytologixTMプロセスにおける、時間、コスト見積もり、および意思決定法を示す。該図は、フルタイムの従業員の必要性、ならびに、発見および開発の各段階でかかる時間およびコストを示す。これは、プロジェクトマネージャーに、重要な意思決定ポイントそれぞれにおけるプロジェクトの進行を評価する機会を与える。

40

【0091】

以下の実施例は、単に説明の目的で提供されるのであって、本発明の範囲を限定することは意図しない。

【0092】

実施例

実施例1. 植物および証拠標本の収集

50

最初に、収集しようとする植物を同定し、次に、新鮮な植物を野原または植物農園のいずれかから収集した。場合によっては、植物全体から植物の部分で切断した。十分な材料が収集され、10～12kgの新鮮な葉、7～8kgの新鮮な実もしくは種または植物全体、もしくは、5～6kgの新鮮な茎または根が提供された。植物全体または植物部分（以下、植物/植物部分と称する）を水で洗い、昆虫、泥およびその他の不純物を除去した。次に、植物/植物部分を、野外で、または、60未満の温度で機械式ドライヤーを用いて、乾燥させた。植物/植物部分の総重量を乾燥の前後で記録された。加えて、乾燥プロセスの結果として生じた植物サンプルにおけるいかなる変化に関して記録を続けた。パッキングする前に、乾燥、昆虫および菌類の感染ならびに清浄度などの様々な条件に関して植物/植物部分を評価した。次に、植物/植物部分を、証拠番号、植物名、植物部分および重量で標識した清潔なバッグに置いた。可能であれば、各植物サンプルを一つのバッグにバックした。しかしながら、植物サンプルが数個のバッグにバックされた場合、バッグの数も、サンプルのラベルに提示された。次に、植物収集フォーム（図1）を書き込み、パッケージされた植物を記入した。数種の個々の植物バッグを板紙箱に置いた。パッキングリストは、パッキングの日付、植物の名前、証拠番号、各植物あたりのバッグの数、および、各植物の重量を含み、該リストを各ボックスに対して作製した。乾燥バッグをボックスに置き、そのボックスを密封した。輸送と取り扱いのプロセスにおける損失またはダメージを防ぐために、収集フォームのコピー（図1）とパッキングリストを郵便で送った。

10

【0093】

証拠標本を準備するため、花および実などの成熟した植物全体を収集した。新鮮な植物を平坦に圧縮し、新聞またはその他の種類の生紙（raw paper）の間に置いた。植物が全体的に乾燥するまで紙を毎日変えた。植物の花および種を別々に小さいバッグに置いた。稔性の植物が利用不可能な場合は、植物の花および/または実に関する情報は、コレクターから得た。しかしながら、植物が開花しているとき、および結実しているときの証拠標本を収集する試みがなされた。個々の証拠番号は、各植物に対して付与された。植物の証拠番号、ラテン名、地域名、収集場所、日付およびコレクター名をラベルに記録し、そのラベルを植物の証拠内に置いた。証拠の2つのセットを準備し、一つは同定目的の植物と共に研究施設に送り、もう一つは、さらなる比較のためにコレクター名と共にファイルに入れた。

20

30

【0094】

研究施設による植物材料を受領した際に、証拠標本を取り、収集記録またはその他の関連する文書のいずれかに添付した。植物サンプルの状態を調べ、植物記録フォームを各サンプルに関して記入した。各サンプルに個別のナンバーを、以下のように割り当てた；植物にはPxxxx、海洋材料にはMxxxx、細菌および微生物にはBxxxx、菌類にはFxxxx、土壌にはSxxxx、動物にはAxxxx、昆虫にはIxxxx、ならびに、鉱物にはMxxxx、ビタミンにはVxxxx、有機合成化合物にはOxxxx、および、ゲノムで調節された二次代謝産物にはGxxxx。このナンバーを証拠標本に添付した。

【0095】

植物サンプルが全体的に乾燥していなかった場合、それをより小さい部分に刻むか砕くかして、できる限りすぐに凍結乾燥させた。標本（10g、標本#1）を各植物サンプルから保存し、その後砕いた。標本を標識したビン（125mL）に置き、使用前に-20で保存した。標本#1は、植物を肉眼および顕微鏡で同定する目的のみに用いた。砕いた後、乾燥粉末の標本（100g、標本#2）を保持し、標識したビン（250mL）に置き、使用前に-20で保存した。標本#2を、植物化学的に同定し比較することに用いた。証拠標本を、収集記録のコピーと植物サンプル（10g）と共に、植物同定のために植物研究所に送った。この同定の結果を植物情報フォームに記録した。植物の状態を再び調べ、植物が乾燥しており、外的要因による荒れ（infestation）がないことを確かめた。次に、砕いた植物サンプルを広口ポリプロピレンビンに置いた。材料の重さ

40

50

を量り、重量をラベルに記録した。次に、植物記録フォーム、植物探索記録および植物情報フォームを適切な職員に提出した。次に、これら全てのフォームからの情報をコンピューターデータベースに入力し、次に、全てのフォームを安全な場所で適切にファイルした。2002年6月の時点で、PhytoloxTMライブラリーは、300種を超過する異なる科、900種の属、および、1100種を超過する異なる種から、トータルで1170種の植物およびその他の天然材料を含む。これら植物は、中国、インド、ガーナ、アメリカ合衆国、ならびに、アジア、南アメリカ、北アメリカ、およびアフリカのその他の国から収集された。

【0096】

実施例2. データベースの作製

カスタマイズされたAccessデータベースを、薬用植物およびその他の天然材料に関する収集された全ての情報を取り扱うために開発した。データベースは、多数の表で構成され、これら表の間の特別に設定された関係も含む。図2で説明されるように、典型的な表は、記録、植物の民族学的な指示、Ext, 分画, Ext. トラッキング, 貯蔵, 化合物タイプ, 化合物登録, 発送人, 活性, 活性などの情報が含まれる。収集された各サンプルについての情報、例えば、ED#, 証拠ID, 属, 種, 科, 植物部分, 植物状態, 植物の新鮮な重量, 乾燥重量, 地質学的分布, 植物の同定, 植物収集フォーム, 抽出物情報, 民族学的指示, 分析結果などが、そのそれぞれの表に保存された。情報をそのそれぞれの表に入力したら、特別に設定したマクロ(図3)および問い合わせを用いて情報を分析し、検索した。情報を図4で説明されたようなレポートのフォームにまとめた。表1は、リウマチ様関節炎および関節炎を治療するのに従来から用いられている薬用植物の検索結果を示す。このような情報は、特定の標的に関して限定された数の植物(20~50)に焦点を当てることによってリサーチ努力を優先させるのに役立つ。この「インフォマテックスデータベース」は、発見プロセスに向けられており、産物発見および開発のリスク、コストおよび時間を顕著に減少させ、本当に新規で有効な産物を発見する可能性を高め得る。

【0097】

実施例3. 植物抽出物ライブラリーの作製

植物材料を2mm以下の粒度に砕いた。次に、乾燥した砕いた植物材料(60g)をErlenmeyerフラスコに移し、メタノール:ジクロロメタン(1:1)(600mL)を加えた。混合物を1時間振盪し、ろ過し、バイオマス 新しいメタノール:ジクロロメタン(1:1)(600mL)で再び抽出した。有機抽出物を合わせ、40の真空下で蒸発させ、有機抽出物を得た(以下の表2を参照)。有機抽出の後、バイオマスを風乾し、超純水(600mL)で1度抽出した。水溶液をろ過し、凍結乾燥し、水性抽出物を得た(以下の表2を参照)。サンプル(100~200mg)を各抽出物(水性および有機性)から保存し、将来的な参照のために-20で保存した。

【0098】

生物学的試験のための抽出物マスタープレートの調製

70±25mgの範囲の各抽出物のサンプルを、バイアルに置き、DMSO(1.5mL)または超純水(1.5mL)を各バイアルに加え、固体が完全に溶解するまで混合物を音波破碎した。次に、溶液を、各バイアルから96ディープウェルブロック中のウェルに移した。位置と対応するサンプルコードを付記した。96ディープ-ウェルブロックを使用前にフリーザーで-70で保存した。生物学的試験を実施するために、サンプルを融解させ、50~200mLのサンプルを、各生物学的試験に用いた。

【0099】

実施例4. 抽出法論の確認

植物材料を2mm以下の粒度に砕いた。次に、乾燥した砕いた植物材料(60g)をErlenmeyerフラスコに移し、メタノール:ジクロロメタン(1:1)(600mL)を加えた。混合物を1時間振盪し、ろ過し、バイオマスをメタノール:ジクロロメタン(1:1)(600mL)で再び抽出した。有機抽出物を合わせ、真空下で蒸発させ、有

10

20

30

40

50

機抽出物を得た（以下の表3を参照）。有機抽出の後、バイオマスを風乾し、超純水（600 mL）で1度抽出した。水溶液をろ過し、凍結乾燥し、水性抽出物を得た（以下の表3を参照）。水性抽出の後、バイオマスを乾燥させ、メタノール（600 mL）で2回抽出した。合わせたメタノール溶液を40の真空下で蒸発させ、MeOH抽出物を得た。同じ植物からの有機、水性およびメタノール抽出物を、フィンガープリント化合物の比較のために、HPLC/PDA/MSで分析した。代表的な結果を図5および6に示す。

【0100】

実施例5．有機抽出物からのHTP分画ライブラリーの作製

有機抽出物（400 mg）を音波破碎下で最少量のMeOH（約1～1.5 mL）に溶解させ、手でプレパックフラッシュカラムにローディングした。（2 cmの内径×8.2 cm, 10 gのシリカゲル）。全ての溶媒が蒸発するまでカラムを真空下で乾燥させた。カラムの溶出は、平行で、日立ハイスルーブット精製（HTP）システムを用いて、（A）50：50のEtOAc：ヘキサンと（B）メタノールとの100%A～100%Bの単一の勾配移動相で、30分間で、流速5 mL/分で、行った。分離を広帯域波長UV検出器を用いてモニターし、溶出液を、96ディープ-ウェルプレートから、ウェルあたり1.9 mLで、Gilsonの分画コレクターを用いて88分画回収（収集）した。サンプルプレートを低真空下で乾燥させ、SavantのSpeed Vac Plus（モデル#SC250DDA）で遠心分離した。図7Aおよび7Bは、薄層クロマトグラフィー（TLC）を用いたHTP分画の分析を説明する。この図は、HTPにより、異なるタイプの化合物が見事に分離されたことを示す。分離された成分は、6～10のセルに分配することができ、ほとんどの場合、各セルは、単一の化合物またはせいぜい3種未満化合物のいずれかを含んでいた。

【0101】

図8は、各ウェルにおけるサンプルの重量分布を示す。TLC化合物スポットに対する重量分布プロフィールにおいて、互いに適合するいくつかのピークが存在した。DMSO（1.5 mL）を各ウェルに加えてサンプルを溶解させ、96ディープ-ウェルプレートで-70で保存した。マスター分画プレートを室温で融解させ、各溶液の一部（50～200 μL）を各ウェルから取り、設定された生物学的試験いずれについても娘プレートを作製した。2つのHTPカラム分画を完了するのに約40分間かかり、8個の96ディープ-ウェルプレートを乾燥させるのに約5時間かかった。有機抽出物のための毎日のスルーブットは、14個のカラムおよび1232個の分画である。表4は、有機抽出物のハイスルーブット分画のコスト分析を示す。

【0102】

実施例6．水性抽出物からのHTP分画ライブラリーの作製

水性抽出物（750 mg）を脱イオン（DI）水（5 mL）に溶解させ、1 μmのシリンジフィルターでろ過し、4 mLのHPLCバイアルに移した。次に、溶液を、オートサンブラーで、プレパック逆相カラムの上に注入した。（C-18、15 μm粒度、プレカラムインサートを有する2.5 cmの内径×10 cm）。カラムの溶出は、日立ハイスルーブット精製（HTP）システムを用いて、（A）水と（B）メタノールとの100%A～100%Bの勾配移動相で、20分間、続いて、100%メタノールで5分間、流速10 mL/分で行った。分離を広帯域波長UV検出器を用いてモニターし、溶出液を、96ディープ-ウェルプレートから、1.9 mL/ウェルで、Gilsonの分画コレクターを用いて、88個の分画を収集した。メタノールを低真空下で除去し、SavantのSpeed Vac Plus（モデル#SC250DDA）を用いて遠心分離し、プレートを凍結乾燥した。滅菌ろ過しエンドトキシン試験した超純水（1.5 mL）を各ウェルに加え、サンプルを溶解させ、使用前に96ディープ-ウェルプレートを-70で保存した。マスター分画プレートを室温で融解させ、溶液の一部（50～200 μL）を各ウェルから取り、設定された生物学的試験いずれについても娘プレートを作製した。図9A～9Lは、Ainsliaea henryiの植物全体からの水性抽出物のHTP分離の再現性を説明する。水性抽出物を、4種の平行C-18カラムで、HTPで、3回分離

し、トータルで12個の96ディープウェルプレートを作製した。12のカラム分離からのH T P / U Vクロマトグラムは同一であり、12個のプレートからの同じウェルの位置に基づきサンプルを合わせた。

【0103】

2種のH T Pカラム分画を完了するのに約20分間かかり、8個の96ディープ-ウェルプレートを乾燥させるのに約10時間かかる。水性抽出物のための毎日のスルーputは、32個のカラム、および、2618個の分画である。表5は、水性抽出物のハイスルーput分画のコスト分析を示す。

【0104】

実施例7. COX-2およびCOX-1の天然阻害剤に関する植物抽出物ライブラリーのスクリーニング

特定のCOX-2阻害剤を同定するためのスクリーニングプロセスに向けられた生物学的試験を設定し、以下で説明するように酵素のペルオキシダーゼ活性を分析した。COX-1およびCOX-2の活性を阻害する化合物をスクリーニングするために、両方の酵素ペルオキシダーゼ活性阻害を利用したハイスルーputのインビトロ分析が開発されている (Raz and Needleman et al. (1990) J. Biol. Chem. 269: 603-607)。簡単に言えば、既知の濃度のUnivesstinTM および/またはその個々の成分(遊離B環フラバノイドまたはフラバン)を、それぞれ固定量のCOX-1およびCOX-2酵素に対して滴定した。各酵素のペルオキシダーゼ活性を補因子としてアラキドン酸の存在下で可視化するために、開裂可能なペルオキシド発色団が分析に含まれた。一般的に、96ウェルフォーマットで分析を行った。各阻害剤は、100% DMSOの10mg/mLのストックから得て、室温で、以下の濃度範囲: 0、0.1、1、5、10、20、50、100、および500 μg/mLを用いて三重に試験された。各ウェルに、150 μLの100 mM トリス-HCl (pH 7.5) を、10 μLの22 μMのヘマチン(トリス緩衝液で希釈した)、10 μLの阻害剤(DMSOで希釈した)、および25ユニットのCOX-1またはCOX-2酵素のいずれかと共に加えた。成分を回転基盤上で10秒混合し、その後、20 μLの2 mMのTMPDおよび20 μLの1.1 mMのアラキドン酸を加え、反応を開始させた。プレートを10秒振盪させ、次に、5分間インキュベートし、その後、570 nmでの吸光度を読み取った。Wallac Victor 2プレートリーダーを用いて発光を読み取った。%阻害に対する阻害剤濃度をプロットし、IC₅₀は、等温線に沿って最大ポイントの半分をとり、x軸上で濃度を交叉させることによって決定された。次に、IC₅₀を、分析における酵素ユニット数に基準化した。図10は、1230種の植物抽出物のスクリーニングから得られたポジティブヒット率を示す。代表的な植物種からの抽出物によるCOX-2ペルオキシダーゼの阻害を表6に示す。表6におけるデータは、組換えヒツジCOX-2酵素および基質単独と比較したペルオキシダーゼ活性のパーセントとして示される。代表的な有機抽出物によるパーセント阻害は、30%~90%の範囲であった。

【0105】

COX-1およびCOX-2アイソフォームの相対的な阻害の比較のために、これら酵素それぞれに対するIC₅₀値を得ることが必要である。IC₅₀は、特定の阻害剤により酵素活性がコントロールに対して50%阻害される濃度と定義される。簡単な例において、IC₅₀値は、表7に示されるように、COX-2およびCOX-1酵素に関して、それぞれ6~50 μg/mL、および、7~80 μg/mLの範囲で見出される。COX-2およびCOX-1のIC₅₀値を比較することにより、様々な植物種からの有機抽出物の、これら酵素それぞれに対する特異性が示される。例えば、Scutellaria laterifloraの有機抽出物は、COX-1よりCOX-2に対して優先的な阻害を示し、IC₅₀値はそれぞれ30 μg/mL (COX-2) および80 μg/mL (COX-1) である。While いくつかの抽出物がCOX-2に対して優先的な阻害を示し、その他は示さなかった。H T P分画の試験、および、これら分画から単離された精製化合物が、これら抽出物および化合物に対する阻害の本当の特異性を測定するのに必

10

20

30

40

50

要である。

【0106】

実施例 8 . 天然阻害剤チロシナーゼに関する植物抽出物ライブラリーのスクリーニング

チロシナーゼ活性を Pomerantz の改変法を用いて測定した (Pomerantz (1991) J Biol. Chem. 241: 161~8)。簡単に言えば、粗抽出物を、DMSO に、濃度 30 mg/mL で溶解させた。次に、サンプルを、リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) で 1:10 に希釈した。10% DMSO / 緩衝液でさらに希釈した。大規模スクリーニングのために、分析を 96 ウェルフォーマットに改変した。サンプル試験ウェルは、50 μL の緩衝液、50 μL の 0.5 mg/mL の抽出物、50 μL の 2 mM の L-dopa、および、50 μL の 50 U/mL のマッシュルームチロシナーゼからなる。ポジティブコントロールは、サンプルを 10% DMSO / 緩衝液で置き換えた以外は上述の通りである。最後に 12 チャンネルのマルチウェルピペットで基質を加え、反応を開始させた。即座に、96 ウェルプレートリーダーで、450 nm でプレートを読み取り、ドーパクロム形成を検出した。次に、プレートを室温でインキュベートし、正確に 1 分後に再び読み取った。吸光度の変化は、2 分間直線的であった。

10

【0107】

コントロール率 (Control rate) は、0.2 A/分、450 nm で最適であると測定された。試験サンプルに関するパーセント阻害が、以下の式を用いて計算された：

パーセント阻害 = $(R_c - R_s) / R_s \times 100$ 、

20

R_c : 吸光度 / 分 (450 nm)、サンプル (コントロール) 非含有、

R_s : 吸光度 / 分 (450 nm)、サンプル含有。

【0108】

粗有機および水性植物抽出物を、96 ウェルプレートフォーマットで、精製マッシュルームチロシナーゼに対して試験した。Pomerantz の改変法を用いて、L-Dopa 基質およびチロシナーゼ酵素の濃度を、直線的にスケールダウンさせた。図 11 は、様々な植物種から得られた 396 種の有機抽出物のチロシナーゼ阻害結果を示す。774 種の植物抽出物のなかから、> 60% 阻害 (5.6% ポジティブヒット) を示す 43 種の抽出物が存在し；6 種の植物が、IC₅₀ < 100 μg/mL (0.78% 確認されたヒット) を示す活性な分画で同定され；および、6 種の活性化合物が単離され、同定された。

30

【0109】

実施例 9 . COX ペルオキシダーゼの阻害剤に関する HTP 分画ライブラリーのスクリーニング

実施例 7 からの個々の生物活性な有機および水性抽出物を、COX-1 および COX-2 組換え酵素の両方のペルオキシダーゼ活性を阻害する能力に関して、実施例 7 で説明された方法を用いてそれぞれを HTP 分画で試験することによってさらに特徴付けた。図 12 は、Camellia sinensis (P0605) の水性抽出物の HTP 分画の広帯域波長 UV クロマトグラムを示す。代表的な COX 阻害の結果は、図 13 で示され、実施例 3 および 6 で説明したように調製された Camellia sinensis (P0605) からの HTP 分画により、COX-2 および COX-1 活性阻害を示す。図 13 で示されたプロフィールは、阻害のピークを示し、これは、特定のレベルの COX-1 に対する選択性を有する分画 C4~E4 (トータルで 16 分画) に存在する。COX-1 および COX-2 酵素両方は、複数の阻害のピークを示し、これは、Camellia sinensis (P0605) からの水性抽出物の初期の阻害プロフィールに寄与する 1 を超過する化合物が存在することを示す。

40

【0110】

実施例 10 . 構造および分光学的特徴からなるデータベースの作製

代表的な構造タイプを含み、量が 5 ~ 500 mg で純度が > 90% (HPLC) の、250 種の純粋な天然産物からなるデータベースを、化合物の国内での単離によって、および、市販の源から化合物を購入することによって作製した (例えば Sigma, Indof

50

ine、およびChromadexから)。各化合物をメタノール(1 mg/mL)に溶解させた。場合によっては、異なるUV吸収およびマスイオン化特性のために、個々の化合物に応じてさらなる希釈および濃度が必要である。LunaC18カラム(2×50 mm, 3 μm)を用いて、流速0.4 mL/分、および、温度35℃で、サンプル溶液をHPLCで分析した。カラムの溶出は、8.5分間行われ、すなわち、10%~90%アセトニトリル(ACN)水溶液で0~4分間、100%ACNで4.1~6.0分間の勾配システム、および、10%ACN水溶液で6.1~8.5分間平衡することによって行われた。溶出液の分析は、フォトダイオードアレイ検出器を波長200~500 nmで用いて；および、以下の条件でイオントラップMSを用いてなされた：検出器475 V、フォーカス35 V、ドリフト40 V、SSIチャンパー0.5 kV、開口度1が150、開口度2が120、カバープレート250、および、ネガティブまたはポジティブ検出。保持時間、UVスペクトル、分子イオンおよびフラグメンテーションを記録し、検索可能なライブラリーに保存した。表8は、構造および分光学的データベースに含まれる典型的な情報を示す。デレプリケーションプロセスにおいて、未知の分画を同じ条件下で分析し、PDA検出からのHPLCピークを構造骨格および化合物タイプに関するUVライブラリーで検索した。分子イオンおよび保持時間を用いて、Dictionary of Natural ProductsおよびNERACデータベースを検索することによって既知化合物を同定した。

10

【0111】

実施例11. COXペルオキシダーゼの阻害剤に関するHTP分画ライブラリーのデレプリケーション

20

HTPプレートからの生物学的試験結果を得た後、デレプリケーションプロセスを開始させた。結果を、図13に示し、これは、COX阻害活性が分画C4~分画E4(トータルで16分画)に存在したことを示す。これら分画を実施例10で説明したようにLC/PDA/MSで別々に分析した。結果を図14に示し、これは、生物活性分画D3のオンラインPDA/MSベースイオンクロマトグラム(BIC)を示す。図15Aおよび15Bは、分画が収集された後、分画D3のUVおよびMSクロマトグラムがオフラインで分析されたことを示す。分画D3に関する分子イオンスペクトルは、図16Aで示されるように、分析がオンラインで実行されてもオフラインで実行されても関係なく、同一であった。実験データおよびDictionary of Natural Productsから得られた情報を用いた、構造および分光ライブラリーの検索に基づき、分画D3は、1つの主要な既知化合物である没食子酸エピガロカテキン(EGCG)を含んでおり(図16B)、これはよく知られたCOX阻害剤である。同じ方法を用いて、全ての16個の活性なHTP分画を、デレプリケーションし、図17で示したように、既知のカテキンおよびフラボノイドを含むことがわかった。

30

【0112】

実施例12. チロシナーゼ阻害剤に関するHTP分画ライブラリーのデレプリケーション

メラニン形成の阻害を、SiegristおよびEberle(x)の改変法により調べた。B16F1マウス黒色腫細胞(2.0×10⁴細胞/mL)をGibcoBKL改変イーグル媒体(10%FBS、1%Gibco非必須アミノ酸、1%PSG、1.5%Gibcoビタミン溶液)で継代培養した。インキュベーション(37℃, 5%CO₂)してから3日後、96ウェルの滅菌培養プレート(Costar)中に細胞を接種させ(2500細胞/ウェル, 200 μL)、一晚インキュベートした(37℃, 5%CO₂)。次の日、細胞培地を、100 μLの新しい培地で置き換えた。抽出物サンプルを、DMISOに濃度30 mg/mLで溶解させ、細胞培地で、別々の滅菌96ウェルプレートに、1:1000に希釈した。サンプル(50 μL)を12ウェルのマルチウェルピペットを用いて希釈プレートから細胞培養プレートへ移した。-メラノサイト刺激ホルモン(a-MSH)(Sigma)を全てのポジティブウェル(150 μM, 50 μL)に加え、メラニン形成を刺激した。-MSH非含有のサンプルウェルを用いて、コントロールとしてのメラニン色素形成とは無関係の450 nmでサンプル吸光度を測定した。4日後に

40

50

メラニン色素形成が見られた。メラニン形成の程度は、96ウェルプレートリーダーで、450nmで測定された。サンプルのパーセント阻害は、以下の式により測定された。

【0113】

【数1】

$$\text{式：パーセント阻害} = \frac{[(AcMSH+) - (AcMSH-)]}{[(AsMSH+) - (AcMSH-)]} \times 100$$

【0114】

AcMSH+ : サンプル非含有MSH含有のセルの450nmでの吸光度、

AcMSH- : サンプル非含有MSH非含有のセルの450nmでの吸光度、

AsMSH+ : サンプル含有MSH含有のセルの450nmでの吸光度、

AsMSH- : サンプル含有MSH非含有のセルの450nmでの吸光度。

【0115】

実施例5で説明するように、*Malilotus repandus* (植物全体) (P0368) から単離された活性な有機抽出物をHTPで分画化した。全てのHTP分画を細胞毒性に対するチロシナーゼ阻害活性に関して試験し、結果を、図18に示した。図18からわかるように、複数のピークが存在し、これは、粗抽出物に多数の活性成分が存在することを示す。分画C10~D10に存在する最大活性ピークは、酵素阻害といよりむしろ細胞毒性による可能性がある。最も興味深い活性は、分画D2~D7のピークに存在し、これらは細胞毒性を有していなかった。これら分画(図19A~P)のHPLC/PDA/MS分析は、ネガティブイオン強度(保持時間16.33分間)において増加を示し、これは、チロシナーゼ阻害活性の位置と一致する。このピークの紫外線およびマススペクトロメトリーによるさらなる分析は(図19G)、この化合物の骨格が、没食子酸塩の骨格であることを示した。実験データおよびDictionary of Natural Productsから得られた情報を用いた、構造および分光ライブラリーの検索に基づき、このピークが、既知のポリフェノール、プテロカリアニン(Pterocaryanin)Bに対応することが決定された。この化合物の構造は、図19Hで示される。ポリフェノールは、チロシナーゼ阻害活性を有することがよく知られている。従って、デレブリケーションプロセスにより、粗抽出物およびHTP分画からのポジティブヒットは、既知の源からのいくつかの細胞毒性に加えて、主として既知化合物によるものであることが迅速に同定された。この植物抽出物をさらに追跡する必要はなかった。

【0116】

実施例13. *Scutellaria orthocalyx*の有機抽出物からの活性な遊離-B環フラボノイドの単離および精製

実施例3で説明したように単離された*Scutellaria orthocalyx*の根からの有機抽出物(5g)を、プレパックフラッシュカラム(120gのシリカ、粒度32~60μm、25cm×4cm)にローディングし、(A)50:50のEtOAc:ヘキサンと(B)メタノールとの100%A~100%Bの勾配移動相で、60分間で、流速15mL/分で溶出させた。分画を試験管に10mL/分画で収集した。溶媒を真空下で蒸発させ、各分画中のサンプルを、1mLのDMSOに溶解させ、20μLのアリコート(96ウェルシャローディッシュプレート)に移し、COX阻害活性に関して試験した。COX分析結果に基づき、活性な分画#31~#39を合わせ、蒸発させた。HPLC/PDAおよびLC/MSによる分析によれば、保持時間8.9分間、および、MSピーク272m/zの主要な化合物が示された。産物の精製は、C18半調製カラム(25cm×1cm)で、(A)水と(B)メタノールとの勾配移動相を用いて、45分間にわたり流速5mL/分で行われた。88個の分画を収集し、5.6mgの白色固体を得た。HPLC/PDAおよびLC/MS、ならびに、標準とNMRデータとの比較により純度を測定した。1HNMR: ppm. (DMSO-d6) 8.088(2H, m, H-3', 5'), 7.577(3H, m, H-2', 4', 6'), 6.932(1H, s, H-8), 6.613(1H, s, H-3). MS: [M+1]+ = 271m/e. 化合

10

20

30

40

50

物をバイカレインと同定した。COX-1に関するIC₅₀は、0.18 μg/mL/ユニット酵素であり、一方で、COX-2に関するIC₅₀は、0.28 μg/mL/ユニットであった(図20)。

【0117】

実施例14. 標準化した栄養補助食品用抽出物のCOX阻害活性のインビボでの研究

インビボでの炎症の阻害を2つのモデルシステムを用いて測定した。第一のシステム(耳膨張モデル)は、アラキドン酸で直接誘導された炎症を測定する。これは、COX-2阻害の優れた測定法であるが、ホスホリパーゼA2(PLA2)による細胞膜のリン脂質からのアラキドン酸遊離の上流で生じ得る細胞性の現象はまったく測定しない。それゆえに、より生物学的に関連する反応において阻害剤がどのように機能するかを調べるために、エアパウチ(air pouch)モデルが用いられた。このモデルは、強い細胞浸潤、および、サイトカインやアラキドン酸代謝産物などの炎症性メディエーター生産を特徴とする炎症性反応を誘導するために、補体の強い活性化剤を利用する。

10

【0118】

耳膨順耳膨張モデルは、アラキドン酸代謝阻害の直接的な測定法であり、以前に説明されている(Greenspan et al. (1999) J. Med. Chem. 42: 164-172; Young et al. (1984) J. Invest. Dermatol. 82: 367-371)。アセトン中のアラキドン酸をマウスの耳に局所塗布する。アラキドン酸代謝により、COX-2のような酵素の作用により生産された炎症性メディエーターが産生される。膨張阻害は、この経路に関与する酵素の阻害の直接的な測定法である。5匹のBalb/Cマウスの7つのグループに、腹腔内(I.P.)または経口(強制栄養による)のいずれかにより、アラキドン酸(AA)適用の24時間および1時間前に、試験化合物の3種の用量を投与した。アセトン中のAA(2mg/15 μL)を左耳に適用し、ネガティブコントロールとしてアセトン(15 μL)を右耳に適用した。1時間後、動物をCO₂吸入により屠殺し、エンジニアのマイクロメーターを用いて耳の厚さを測定した。コントロールは、AA投与されたが抗炎症剤で処理されていない動物、および、AAとインドメタシン(I.P.)5mg/kgとで処理された動物、であった。

20

【0119】

結果は、図21に示され、それによれば、2つの時点(24時間および1時間)に、経口(強制栄養による)または腹腔内(IP)のいずれかにより投与された3種の抽出物の効果を示す。IPおよび強制栄養両方で運搬した場合、S. baicalensisから単離された遊離B環フラボノイドは、膨張を抑制し、IPがより有効であった(図21Aおよび21B)。S. orthocalyxから単離された遊離B環フラボノイドは、これら代謝産物の生産を抑制したwhen経口ではなくIPで投与したが、それに反して、S. laterifloraから単離された抽出物は、インビボで有効であるにもかかわらず、インビボでは効果を示さなかった(データは示さず)。

30

【0120】

実施例15. Phytologix™基盤の結果に基づき栄養補助食品製品としての天然のCOX-2阻害剤を開発すること

数年間、COX-II阻害剤の化学的特徴を有する新規の栄養補助食品成分を発見するために、Phytologix™プロセスを用いて数千もの植物抽出物をスクリーニングしていた。複数の酵素的および細胞型分析に対して、1230種の植物抽出物ライブラリーを天然のCOX-2阻害剤に関してスクリーニングし、1.8%のポジティブヒットが得られた。22種の活性な抽出物を上述したハイスループット精製システムを用いてさらに試験し、単離された純粋な化合物を上述したCOX分析を用いて試験した。純粋な化合物および植物抽出物の生物活性を、ヒツジCOX-1およびCOX-2酵素、ヒトCOX-2酵素、ミツバチ毒PLA2、ヒト5-LO、ヒト末梢血液細胞、およびTHP-1細胞系分析を用いて確認した。次に、インビボモデルに基づき有効であることが決定されたこれら抽出物を、エアパウチおよび局所的耳膨張モデルの両方を用いて、複数の経路(IPおよび経口)で投与された場合のインビボで炎症を阻害する能力に関して試験した

40

50

。これまで、これら研究により、全ての試験レベルにわたって活性を有する抗炎症剤として遊離B環フラボノイドおよびフラバンが同定されている。

【0121】

これら広範囲な試みにより物質の新規の組成物が発見され、該物質はUnivestinTMと呼ばれ、2002年3月22日付けで出願された米国特許出願第10/104,477号、表題「Isolation of a Dual COX-2 and 5-Lipoxygenase Inhibitor from Acacia」で説明されている。この物質の組成物は、特定の化合物の2つのクラス、遊離B環フラボノイドおよびフラバンの混合物を含む。この物質の組成物は、COX-2酵素を直接抑制するだけでなく、5-リポキシゲナーゼ活性も抑制し、遺伝子発現レベルで影響を有することが示されている。UnivestinTMの炎症性プロセスを阻害する能力は、試験モデルの4つのレベル、すなわち遺伝子発現、精製酵素、細胞に基づく分析、および、インビボでの動物モデルで実証された。この産物の効率は、医薬およびその他の標準化した植物抽出物に対して評価された。COX-2阻害に関して、一般的に、UnivestinTMは、インビボにおいて、イブプロフェンより8~10倍優れて作用し、処方箋によってのみ利用可能な効力のある抗炎症性剤であるインドメタシンと同等か、またはそれより優れている。加えて、UnivestinTMは、これら2種の薬物より利点を有し、すなわち、炎症反応が起こっている細胞においてLTB4生産も抑制し、それに反して、イブプロフェンやインドメタシンは、細胞からの放出を抑制することしか出来ない。これは、遊離B環フラボノイドとCOX-2阻害活性との相関性の初めての報告であると考えられている。また、とも考えられている。これは、フラバンが5-LO経路を抑制することに関する初めての報告である。COX-2および5-LOが介在する病気や症状を予防および治療するための、この新規の2種の特定な化合物クラスの混合物は、数種の炎症性疾患を治療するための栄養補助食品の新規のクラスを代表する。産物およびその成分は、細胞および動物モデルにおける安全性に関して評価された。急性プロトコールにおいて、高濃度の遊離B環フラボノイドおよびフラバンを含む個々に標準化した抽出物、同様に、UnivestinTM製品を、投与量2g/kg(ヒト一日量500mgに対して20回)で投与したところ、重量の増加、外観、挙動、器官の全般的な検死外観、胃および肝臓の組織学、ならびに、血液研究において異常は起こらなかった。

【0122】

図22は、栄養補助食品製品 - UnivestinTMの販売シートの例を示し、図23は、該製品の分析証明書(COA)である。

【0123】

実施例16. 栄養補助食品および化粧用製品を発見するためのPhytologixTMプロセス

新規の栄養補助食品および化粧用組成物を発見するためのPhytologixTMプロセスは、図24および25で図式的に示される2種の別々のプロトコールで説明することができる。図24に示すように、Phytologixによる発見は、薬用植物ライブラリーに貯蔵された千の薬用植物の収集から始められる。指標および使用に基づくインフォマティックデータベース検索により、似たような伝統的な用途を有する20~50種の薬用植物が得られる可能性がある。次に、これら植物を実施例3で説明したように抽出し、開発された生化学的、生物学的および遺伝子発現標的に対して、好ましくはハイスループットモデルで、上述の選択された標的および指標に基づき、有機および水性抽出物をスクリーニングすることができる。可能であれば、植物全体ライブラリーは、可能性のあるヒット数を最大化するために、抽出物および/またはHTP分画の形態で、ハイスループットスクリーニング(HTS)システムによりスクリーニングしてもよい。次に、ポジティブヒットに、上述した分画化、デレプリケーション、単離、および、再分析を行い、上記実施例で説明したような新規の活性天然産物の同定を可能にする。次に、植物抽出物の標準化および/または濃縮および/または精製を、活性プロフィールおよび化学フィンガープリントに基づき続けることができる。インビトロおよびインビボモデルでの、標準化し

た抽出物および/または濃縮した成分および/または精製された活性化合物の、安全性および毒性の二次効率分析および評価により、複数の可能性を限られた数の候補産物に最適化することができる。

【0124】

図25で説明するように、PhytologixTMプロセスは、薬理的、化学的および安全性プロフィールが以前の発見プロセスで作製された候補産物から始められる。候補に関する情報のさらなる検索は、知的財産の位置付け、可能性のある製造のための原料植物の調達、市場および規定に焦点を当てる。これら試みにより、産物の新規制、市場での可能性、および、さらなる開発計画に関する結論を得ることができる。開発の最終フェーズは、製造プロセス、品質制御方法論、プロトタイプ製品、プロトタイプ製品に基づく効率および安全性のさらなる確認、臨床評価、ならびに、最終産物の発売を行うことである。

10

【0125】

産物発見および開発の試みを目的とした実践的なガイドラインを含むPhytologixTMプロセスを、時間効率的かつコストに敏感にするために、2つのプロセス制御メカニズムが開発された。図26で示すように、PhytologixTMタスクチェックリストは、様々な段階の発見および開発プロセスの際に用いることができ、重要なタスクを実行するのに有用であり、最終産物に関する重要な情報やデータの見落としを防ぐことができる。図27で説明されたように、コストおよび時間見積もりの作製が作製され、全プロセスで必要な労働、予算および時間の一般的なアウトラインを用いてプロジェクトを管理することができる。分析の最も重要な部分は、プロジェクトの進行および重要なデータポイントから得られた結論に基づく意思決定プロセスである。

20

【0126】

【表1】

表1. リウマチ様関節炎および関節炎の治療に伝統的に用いられる薬用植物の検索結果

リウマチ様関節炎		関節炎	
P0110	<i>Uvaria microcarpa</i>	P0126	<i>Wikstroemia micrantha</i>
P0177	<i>Clerodendrum bungei</i>	P0193	<i>Cajanus</i>
P0340	<i>Zanthoxylum frazineum</i>	P0236	<i>Anemone tomentosa</i>
P0369	<i>Ampelopsis delavayana</i>	P0239	<i>Livistona chinensis</i>
P0412	<i>Peucedanum dielsianum</i>	P0397	<i>Brassica juncea</i>
P0414	<i>Lycopodium japonicum</i>	P0536	<i>Lepidium apetalum</i>
P0437	<i>Sargentodoxa cuneata</i>	P0574	<i>Imperata cylindrica var. major C.E.</i>
P0444	<i>Drynaria baronii</i>	P0582	<i>Ligusticum brachylobum</i>
P0449	<i>Aconitum carmichaeli</i>	P0588	<i>Pharbitis nil</i>

30

【0127】

【表2】

40

表 2. 様々な植物種からの代表的な有機および水性抽出物

植物名 (ラテン)	植物部分	ID #	量	有機抽出物	水性抽出物
<i>Catharanthus Roseus (White)</i>	植物全体	P0066	60 g	5.16 g	5.49 g
<i>Scutellaria baicaensis</i>	根	P0987	60 g	9.18 g	7.18 g
<i>Cassia tora</i>	種	P0124	60 g	10.67 g	7.7 g
<i>Mahonia fortunei</i>	茎	P0585	60 g	4.17 g	2.26 g
<i>Caesalpiaceae Afzelia</i>	葉	P0079	60 g	3.21 g	4.58 g
<i>Gardenia jasminoides</i>	果実	P0012	60 g	8.4 g	9.64 g
<i>Albizia julibrissin</i>	外皮	P0430	60 g	5.87 g	2.56 g
<i>Magnolia biondii</i>	花	P0451	60 g	5.91 g	4.17 g
<i>Angiopteris Omeiensis</i>	根茎	P0095	60 g	4.8 g	6.78 g

10

【 0 1 2 8 】

【 表 3 】

表 3. 異なる植物材料からの有機、水性およびメタノール抽出物の比較

ID #	ラテン名	植物部分	有機抽出物 (g)	水性抽出物 (g)	MeOH 抽出物 (g)
P0490	<i>Daphne genkwa Sieb. Et Zucc.</i>	花	6.178	5.022	1.289
P0491	<i>Magnolia officinalis Rehd. Et Wiis</i>	樹幹の外皮	7.617	2.44	0.485
P0492	<i>Portulaca oleracea L.</i>	植物全体	2.579	6.881	0.577
P0493	<i>Thalictrum glandubsissimum</i>	根茎	5.356	4.919	0.895
P0495	<i>Crataegus Pinnatifida Bge.</i>	果実	14.243	8.56	0.39
P0496	<i>Perilla Frotescans (L.) Britt</i>	葉	3.614	5.197	0.919

20

【 0 1 2 9 】

【 表 4 】

表 4. 有機抽出物のハイスルーブット分画化のコスト分析

項目	供給量 (1 samp)	材料の価格	材料の単価	コスト/サンプル	総コスト/サンプル	総コスト/分画
MeOH	105 mL	\$54/20 L	\$0.0027/mL	\$ 0.28	\$15.32	\$ 0.16
EtOAc	40 mL	\$174.05/20 L	\$0.0087/mL	\$ 0.35		
ヘキサン	40 mL	\$116.88/16 L	\$0.0073/mL	\$ 0.29		
カラム		\$137/20	\$6.85	\$ 6.85		
ディーブウェル		\$200/50	\$4/ea	\$ 4.00		
ウェルマット		\$150/50	\$3/ea	\$ 3.00		
シンチレーションバイアル (20mL)		\$128.55/500	\$0.26/ea	\$ 0.26		
シリンジ		\$28.64/100	\$0.29/ea	\$ 0.29		
総コスト: \$15.32/サンプル						
\$0.16/分画						

30

40

【 0 1 3 0 】

【 表 5 】

表 5. 水性抽出物のハイスルーブット分画化のコスト分析

項目	供給量 (2サンプル)	材料の価格	材料の単価	コスト/ サンプル	総コスト/ サンプル	総コスト/ 分画
MeOH	550 mL	\$54/20 L	\$0.0027/mL	\$ 0.75	\$10.94	\$ 0.11
THF	100 mL	\$54.70/4 L	\$0.013/mL	\$ 0.65		
オートサンプラー バイアル	2	\$32/200	\$0.16/ea	\$ 0.16		
フィルター	2	\$274.34/150	\$1.83/ea	\$ 1.83		
シリンジ	2	\$28.64/100	\$0.29/ea	\$ 0.29		
シンチレーション バイアル	2	\$128.55/500	\$0.26/ea	\$ 0.26		
ディープウェル ウェルマット	2	\$200/50 \$150/50	\$4/ea \$3/ea	\$ 4.00 \$ 3.00		
カラム	2	\$400/40smp	\$10/smp	\$ 10.00	\$20.26	\$ 0.21
カラム ガード	2	\$205/20smp	\$10.26/smp	\$ 10.26		
カラム ホルダー	2	\$460/ea				
総コスト: \$31.20/サンプル \$0.32/分画						

10

20

【 0 1 3 1 】

【 表 6 】

表 6. 代表的な植物種からの抽出物によるCOX-2ペルオキシダーゼ活性阻害

植物源	有機抽出物による COX-2阻害	水性抽出物による COX-2阻害
<i>Scutellaria orthocalyx</i> (根)	55%	77%
<i>Scutellaria baicaensis</i> (根)	75%	0%
<i>Desmodium sambuense</i> (植物全体)	55%	39%
<i>Eucalyptus globulus</i> (葉)	30%	10%
<i>Murica nana</i> (葉)	90%	0%

30

【 0 1 3 2 】

【 表 7 】

表 7. ヒトおよびヒツジのCOX-2およびCOX-1に関するIC₅₀値

植物源	IC ₅₀ ヒト COX-2 ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ ヒツジ COX-2 ($\mu\text{g/MI}$)	IC ₅₀ ヒツジ COX-1 ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Scutellaria orthocalyx</i> (根)	ND	10	10
<i>Scutellaria baicalensis</i> (根)	30	20	20
<i>Scutellaria lateriflora</i> (植物全体)	20	30	80
<i>Eucalyptus globulus</i> (葉)	ND	50	50
<i>Murica nana</i> (葉)	5	6	7

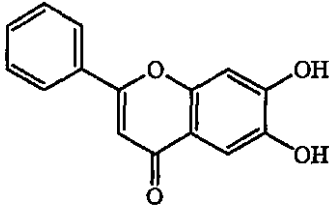
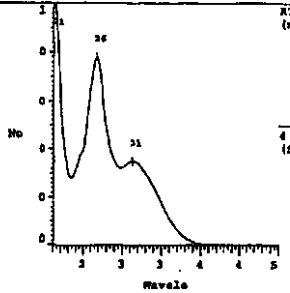
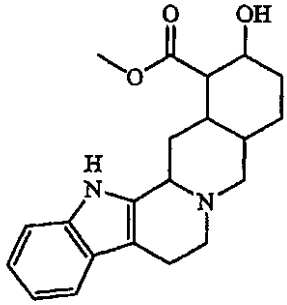
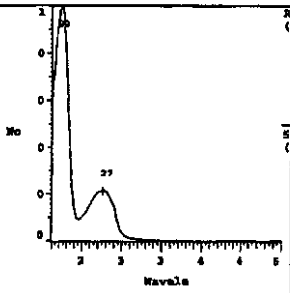
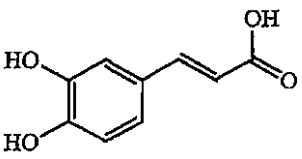
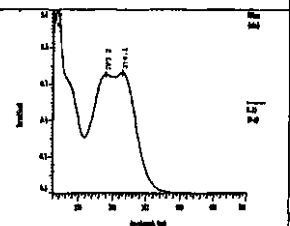
40

【 0 1 3 3 】

50

【表 8】

表 8. 一般的な情報 in 構造および分光学的データベース

タイプ	名前	MW	構造	UVスペクトル
フラボノイド	7, 8-ジヒドロキシ- フラボン	254.24	[480-40-0] 	 Rt = 4.96 分
アルカロイド	コリナンチン	354.45	[483-10-3] 	 Rt = 5.47 分
コーヒー酸	コーヒー酸	180.16	[331-39-5] 	 Rt = 0.93 分

10

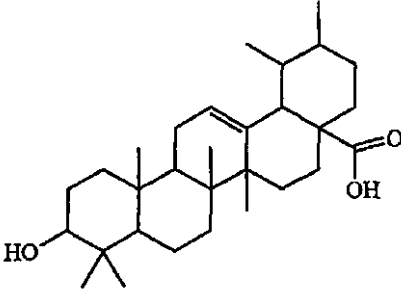
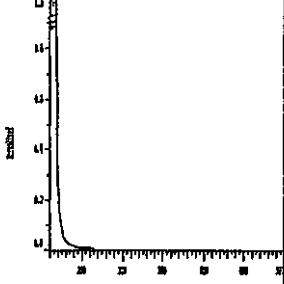
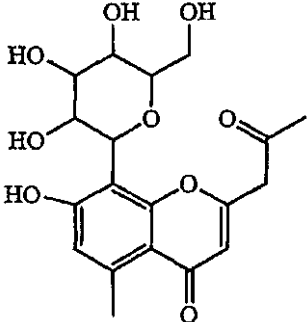
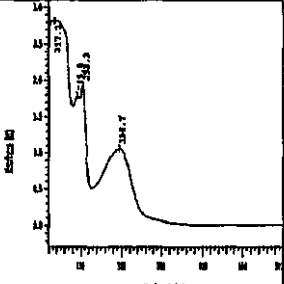
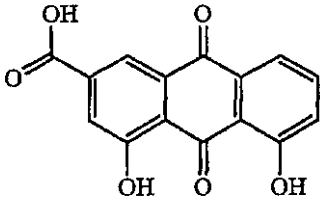
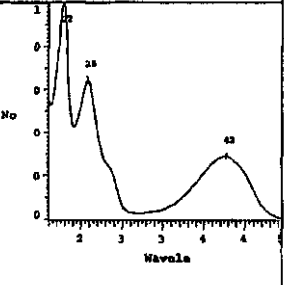
20

30

【 0 1 3 4 】

【表 9】

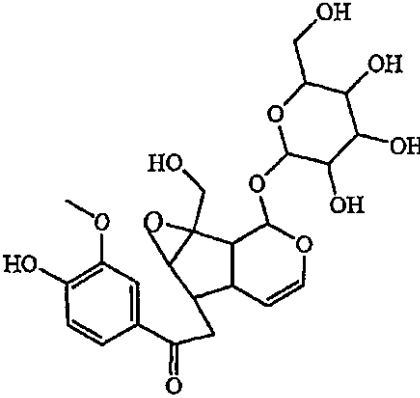
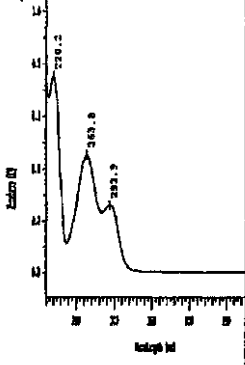
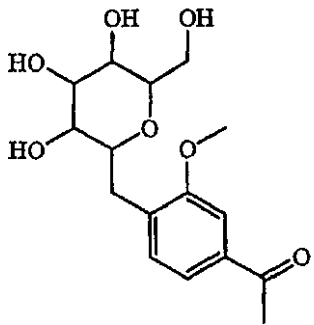
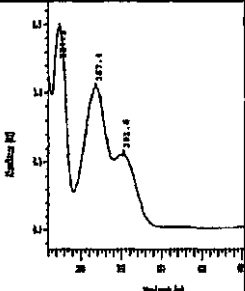
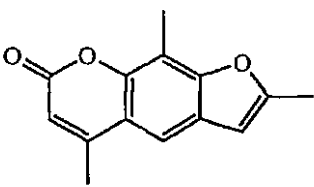
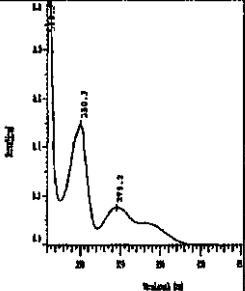
表 8 続き

テルペノイド	ウルソール酸	456.70	<p>[77-52-1]</p> 	 <p>Rt = 6.45 分</p>	10
クロモン	アロエシン	394.38	<p>[30861-27-9]</p> 	 <p>Rt = 0.96 分</p>	20
アントラキノン	レイン	284.2	<p>[478-43-3]</p> 	 <p>Rt = 3.92 分</p>	30

【 0 1 3 5 】

【 表 1 0 】

表 8 続き

イリドイド	ピクロシドⅡ	512.47	<p style="text-align: center;">[39012-20-9]</p> 	 <p style="text-align: center;">Rt = 3.79 分</p>	10
アセトフェノン	アンドロシン	328	<p style="text-align: center;">[531-28-2]</p> 	 <p style="text-align: center;">Rt = 1.15 分</p>	20
クマリン	トリオキサレン	228.24	<p style="text-align: center;">[3902-71-4]</p> 	 <p style="text-align: center;">Rt = 5.12 分</p>	30

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】図1は、薬用植物コレクターにより提出された代表的な収集フォームを示す。示された収集フォームは、植物起源、植物の同定、地質学的分布、民族学的指標、化学成分および参考文献に関する情報を含む。

40

【図2】図2は、植物、リサーチデータおよび参考文献に関する全ての情報を含むデータベース中の、表およびそれら表の関係を示す。

【図3】図3は、特定の問い合わせに基づく最終報告を作製するために、データベース中の表から情報を引き出すように設計されたマクロを示す。

【図4】図4は、植物の情報、植物の重量、抽出物の重量および民族学的指標を含む Polygonum viviparum に関する代表的な植物情報の概要を示す。

【図5A】図5は、Daphne genkwa (P0490) の花からの有機抽出物 (図5A)、水性抽出物 (図5B) およびメタノール抽出物 (図5C) の HPLC/UVC クロマトグラムを示す。メタノール抽出物において特定のピークは存在せず、有機抽出物ま

50

たは水性抽出物のいずれにも存在しなかった。

【図5B】図5は、*Daphne genkwa* (P0490)の花からの有機抽出物(図5A)、水性抽出物(図5B)およびメタノール抽出物(図5C)のHPLC/UVクロマトグラムを示す。メタノール抽出物において特定のピークは存在せず、有機抽出物または水性抽出物のいずれにも存在しなかった。

【図5C】図5は、*Daphne genkwa* (P0490)の花からの有機抽出物(図5A)、水性抽出物(図5B)およびメタノール抽出物(図5C)のHPLC/UVクロマトグラムを示す。メタノール抽出物において特定のピークは存在せず、有機抽出物または水性抽出物のいずれにも存在しなかった。

【図6A】図6は、*Daphne genkwa* (P0490)の花からの有機抽出物(図6A)、水性抽出物(図6B)およびメタノール抽出物(図6C)の、HPLC/MSのトータルイオンクロマトグラム(TIC)を示す。メタノール抽出物において特定のピークは存在せず、有機抽出物または水性抽出物のいずれにおいても存在しなかった。

【図6B】図6は、*Daphne genkwa* (P0490)の花からの有機抽出物(図6A)、水性抽出物(図6B)およびメタノール抽出物(図6C)の、HPLC/MSのトータルイオンクロマトグラム(TIC)を示す。メタノール抽出物において特定のピークは存在せず、有機抽出物または水性抽出物のいずれにおいても存在しなかった。

【図6C】図6は、*Daphne genkwa* (P0490)の花からの有機抽出物(図6A)、水性抽出物(図6B)およびメタノール抽出物(図6C)の、HPLC/MSのトータルイオンクロマトグラム(TIC)を示す。メタノール抽出物において特定のピークは存在せず、有機抽出物または水性抽出物のいずれにおいても存在しなかった。

【図7】図7は、*Pulsatilla chinensis*の根からの有機抽出物に関するハイスループット精製システムの分離効率を示す。その他のHTP分画をいずれもシリカゲルTLCプレートにスポットして展開し、ヘキサン中の60%EtOAcで展開した。TLCプレートに硫酸中の着色剤ニコチンアルデヒド(nicotinaldehyde)を広げた。

【図8】図8は、*Pulsatilla chinensis*の根からの有機抽出物の分画化から収集された96ディープウェルプレートにおける各HTP分画の重量分布を示す。

【図9A】図9A~9Lは、本明細書で開示されたハイスループット精製システム再現性を示す。特に、これらは、*Ainsliaea henryi*の植物全体から単離された同じ水性抽出物の12の逆相C-18カラム分画化からの12のHTP/UVクロマトグラムを示す。

【図9B】図9A~9Lは、本明細書で開示されたハイスループット精製システム再現性を示す。特に、これらは、*Ainsliaea henryi*の植物全体から単離された同じ水性抽出物の12の逆相C-18カラム分画化からの12のHTP/UVクロマトグラムを示す。

【図9C】図9A~9Lは、本明細書で開示されたハイスループット精製システム再現性を示す。特に、これらは、*Ainsliaea henryi*の植物全体から単離された同じ水性抽出物の12の逆相C-18カラム分画化からの12のHTP/UVクロマトグラムを示す。

【図9D】図9A~9Lは、本明細書で開示されたハイスループット精製システム再現性を示す。特に、これらは、*Ainsliaea henryi*の植物全体から単離された同じ水性抽出物の12の逆相C-18カラム分画化からの12のHTP/UVクロマトグラムを示す。

【図9E】図9A~9Lは、本明細書で開示されたハイスループット精製システム再現性を示す。特に、これらは、*Ainsliaea henryi*の植物全体から単離された同じ水性抽出物の12の逆相C-18カラム分画化からの12のHTP/UVクロマトグラムを示す。

【図9F】図9A~9Lは、本明細書で開示されたハイスループット精製システム再現性を示す。

を示す。特に、これらは、*Ainsliaea henryi*の植物全体から単離された同じ水性抽出物の12の逆相C-18カラム分画化からの12のH T P / U Vクロマトグラムを示す。

【図9 G】図9 A ~ 9 Lは、本明細書で開示されたハイスループット精製システム再現性を示す。特に、これらは、*Ainsliaea henryi*の植物全体から単離された同じ水性抽出物の12の逆相C-18カラム分画化からの12のH T P / U Vクロマトグラムを示す。

【図9 H】図9 A ~ 9 Lは、本明細書で開示されたハイスループット精製システム再現性を示す。特に、これらは、*Ainsliaea henryi*の植物全体から単離された同じ水性抽出物の12の逆相C-18カラム分画化からの12のH T P / U Vクロマトグラムを示す。

10

【図9 I】図9 A ~ 9 Lは、本明細書で開示されたハイスループット精製システム再現性を示す。特に、これらは、*Ainsliaea henryi*の植物全体から単離された同じ水性抽出物の12の逆相C-18カラム分画化からの12のH T P / U Vクロマトグラムを示す。

【図9 J】図9 A ~ 9 Lは、本明細書で開示されたハイスループット精製システム再現性を示す。特に、これらは、*Ainsliaea henryi*の植物全体から単離された同じ水性抽出物の12の逆相C-18カラム分画化からの12のH T P / U Vクロマトグラムを示す。

【図9 K】図9 A ~ 9 Lは、本明細書で開示されたハイスループット精製システム再現性を示す。特に、これらは、*Ainsliaea henryi*の植物全体から単離された同じ水性抽出物の12の逆相C-18カラム分画化からの12のH T P / U Vクロマトグラムを示す。

20

【図9 L】図9 A ~ 9 Lは、本明細書で開示されたハイスループット精製システム再現性を示す。特に、これらは、*Ainsliaea henryi*の植物全体から単離された同じ水性抽出物の12の逆相C-18カラム分画化からの12のH T P / U Vクロマトグラムを示す。

【図10】図10は、COX阻害活性に関する1230種の植物抽出物のスクリーニングから得られたポジティブヒット率を示す。ポジティブヒット率は、有機抽出物に関して1.2%ポジティブであり、水性抽出物に関して0.6%であった。このスクリーニングにより、22種の活性な植物抽出物が同定された。

30

【図11】図11は、様々な植物種からの396種の有機抽出物のチロシナーゼ阻害分布パターンを示す。トータルで36種の植物抽出物が、チロシナーゼ活性の>60%阻害を示し、9.1%のポジティブヒット率を有していた。

【図12】図12は、*Camellia sinensis* (P0605)の葉からの水性抽出物の逆相分画化のH T P / U Vクロマトグラムを示す。

【図13】図13は、*Camellia sinensis* (P0605)の葉の水性抽出物からの様々なH T P分画により、COX-1 () およびCOX-2 () の阻害を図示する。

【図14】図14は、*Camellia sinensis* (P0605)の葉の水性抽出物から得られた生物活性H T P分画D3のオンラインP D A / M Sベースイオンクロマトグラム (B I C) を示す。

40

【図15 A】図15は、*Camellia sinensis* (P0605)の葉の水性抽出物から得られたH T P生物活性分画D3のオフライン分析からのH P L C / P D Aクロマトグラム (図15 A) およびH P L C / M Sトータルイオンクロマトグラム (T I C) (図15 B) を示す。

【図15 B】図15は、*Camellia sinensis* (P0605)の葉の水性抽出物から得られたH T P生物活性分画D3のオフライン分析からのH P L C / P D Aクロマトグラム (図15 A) およびH P L C / M Sトータルイオンクロマトグラム (T I C) (図15 B) を示す。

50

【図16A】図16Aは、オンラインH T P / M SおよびオフラインH P L C / M Sからのデータ収集に基づくH T P生物活性分画D 3の同一なマススペクトルを示す。

【図16B】図16Bは、実施例11で説明されたデレプリケーション法の結果を示す。図16Bからわかるように、分画D 3は、単一の既知化合物 - 没食子酸エピガロカテキン（その構造を図中に示す）を含んでいた。

【図17】図17は、*Camellia sinensis* (P 0 6 0 5)の水性抽出物からの16種の生物活性H T P分画全てのデレプリケーションの結果を示す。10種の化合物が24個のH T P分画中に存在し、その全ての構造は既知であり、図17に示される。

【図18】図18は、*Mallothus repandus* (P 0 3 6 8)の植物全体の有機抽出物からのH T P分画の、細胞毒性に対するメラニン生成阻害活性を示す。メラニン生成阻害活性を示す複数のピークは、多数の活性成分が粗抽出物中に存在することを示す。分画C 1 0 ~ D 1 2にわたり存在するピークは、細胞毒性により生じた誤ったピークである。

【図19A】図19は、*Mallothus repandus* (植物全体) (P 0 3 6 8)から得られた表題の有機抽出物のH T P分画のメラニン阻害分析から同定された活性ピークのデレプリケーションの結果を示す。図19A ~ Fは、オフラインL C / M Sから収集された活性な分画D 2 ~ D 7トータルイオンクロマトグラムを示す。保持時間16.33分に存在するピークは、分画D 3 ~ D 6で出現しており、チロシナーゼ阻害のピークと正確に適合する。図19Gは、分画D 4からのこのピークのマスペクトル (R t = 16.33分)を示す。デレプリケーションにより、既知のポリフェノールプテロカリアニン (P t e r o c a r y a n i n) B (図19H)が同定された。

【図19B】図19は、*Mallothus repandus* (植物全体) (P 0 3 6 8)から得られた表題の有機抽出物のH T P分画のメラニン阻害分析から同定された活性ピークのデレプリケーションの結果を示す。図19A ~ Fは、オフラインL C / M Sから収集された活性な分画D 2 ~ D 7トータルイオンクロマトグラムを示す。保持時間16.33分に存在するピークは、分画D 3 ~ D 6で出現しており、チロシナーゼ阻害のピークと正確に適合する。図19Gは、分画D 4からのこのピークのマスペクトル (R t = 16.33分)を示す。デレプリケーションにより、既知のポリフェノールプテロカリアニン (P t e r o c a r y a n i n) B (図19H)が同定された。

【図19C】図19は、*Mallothus repandus* (植物全体) (P 0 3 6 8)から得られた表題の有機抽出物のH T P分画のメラニン阻害分析から同定された活性ピークのデレプリケーションの結果を示す。図19A ~ Fは、オフラインL C / M Sから収集された活性な分画D 2 ~ D 7トータルイオンクロマトグラムを示す。保持時間16.33分に存在するピークは、分画D 3 ~ D 6で出現しており、チロシナーゼ阻害のピークと正確に適合する。図19Gは、分画D 4からのこのピークのマスペクトル (R t = 16.33分)を示す。デレプリケーションにより、既知のポリフェノールプテロカリアニン (P t e r o c a r y a n i n) B (図19H)が同定された。

【図19D】図19は、*Mallothus repandus* (植物全体) (P 0 3 6 8)から得られた表題の有機抽出物のH T P分画のメラニン阻害分析から同定された活性ピークのデレプリケーションの結果を示す。図19A ~ Fは、オフラインL C / M Sから収集された活性な分画D 2 ~ D 7トータルイオンクロマトグラムを示す。保持時間16.33分に存在するピークは、分画D 3 ~ D 6で出現しており、チロシナーゼ阻害のピークと正確に適合する。図19Gは、分画D 4からのこのピークのマスペクトル (R t = 16.33分)を示す。デレプリケーションにより、既知のポリフェノールプテロカリアニン (P t e r o c a r y a n i n) B (図19H)が同定された。

【図19E】図19は、*Mallothus repandus* (植物全体) (P 0 3 6 8)から得られた表題の有機抽出物のH T P分画のメラニン阻害分析から同定された活性ピークのデレプリケーションの結果を示す。図19A ~ Fは、オフラインL C / M Sから収集された活性な分画D 2 ~ D 7トータルイオンクロマトグラムを示す。保持時間16.3

3分に存在するピークは、分画D3～D6で出現しており、チロシナーゼ阻害のピークと正確に適合する。図19Gは、分画D4からのこのピークのマススペクトル($R_t = 16.33$ 分)を示す。デレプリケーションにより、既知のポリフェノールプテロカリアニン(Pterocaryanin)B(図19H)が同定された。

【図19F】図19は、*Mallotus repandus*(植物全体)(P0368)から得られた表題の有機抽出物のHTP分画のメラニン阻害分析から同定された活性ピークのデレプリケーションの結果を示す。図19A～Fは、オフラインLC/MSから収集された活性な分画D2～D7トータルイオンクロマトグラムを示す。保持時間16.33分に存在するピークは、分画D3～D6で出現しており、チロシナーゼ阻害のピークと正確に適合する。図19Gは、分画D4からのこのピークのマススペクトル($R_t = 16.33$ 分)を示す。デレプリケーションにより、既知のポリフェノールプテロカリアニン(Pterocaryanin)B(図19H)が同定された。

10

【図19G】図19は、*Mallotus repandus*(植物全体)(P0368)から得られた表題の有機抽出物のHTP分画のメラニン阻害分析から同定された活性ピークのデレプリケーションの結果を示す。図19A～Fは、オフラインLC/MSから収集された活性な分画D2～D7トータルイオンクロマトグラムを示す。保持時間16.33分に存在するピークは、分画D3～D6で出現しており、チロシナーゼ阻害のピークと正確に適合する。図19Gは、分画D4からのこのピークのマススペクトル($R_t = 16.33$ 分)を示す。デレプリケーションにより、既知のポリフェノールプテロカリアニン(Pterocaryanin)B(図19H)が同定された。

20

【図19H】図19は、*Mallotus repandus*(植物全体)(P0368)から得られた表題の有機抽出物のHTP分画のメラニン阻害分析から同定された活性ピークのデレプリケーションの結果を示す。図19A～Fは、オフラインLC/MSから収集された活性な分画D2～D7トータルイオンクロマトグラムを示す。保持時間16.33分に存在するピークは、分画D3～D6で出現しており、チロシナーゼ阻害のピークと正確に適合する。図19Gは、分画D4からのこのピークのマススペクトル($R_t = 16.33$ 分)を示す。デレプリケーションにより、既知のポリフェノールプテロカリアニン(Pterocaryanin)B(図19H)が同定された。

【図20】図20は、*Scutellaria baicalensis*(P0483)の根から単離された遊離B環フラボノイド、バイカレインによる、COX-1およびCOX-2の阻害プロフィールを図示する。該化合物を、組換えヒツジCOX-1()またはヒツジCOX-2()のそのペルオキシダーゼ活性阻害に関して試験した。データを阻害剤を用いない分析のパーセント阻害で示す。COX-1に関する IC_{50} は、 $0.18 \mu\text{g}/\text{mL}$ /酵素ユニットであり、一方、COX-2に関する IC_{50} は、 $0.48 \mu\text{g}/\text{mL}$ /ユニットであった。

30

【図21A】図21は、*Scutellaria baicalensis*の根から単離された標準化した遊離B環フラボノイド抽出物により、アラキドン酸阻害が炎症を誘導したことを示す。インビボでの効率の評価は、アラキドン酸の直接適用により誘導された膨張を阻害する能力に基づきなされた。処理した耳とコントロールの耳との間の膨張における平均の差を図21Aに示す。

40

【図21B】図21Bは、アラキドン酸処理コントロールと比較した各グループパーセント阻害を示す。

【図22】図22は、本発明のPhytologixTM技術基盤を用いて発見および開発された栄養補助食品UnivestTMの販売シートを示す。

【図23】図23は、栄養補助食品および化粧品市場で売られている市販品としてのUnivestTMある代表的なバッチに関する分析の証明書(COA)を示す。

【図24】図24は、PhytologixTM発見プロセスを図式的に示す。植物収集ライブラリーの分析および市場の要求から、優先的な植物抽出物を分析するためにハイスループットスクリーニングモデルを開発した。生物活性を同定した後、標準化した抽出物/濃縮した分画/純粋な化合物に基づき、薬理的および安全性プロフィールを作製した

50

。このプロセスの生産品は、候補産物である。

【図25】図25は、Phytologix™ 開発プロセスを図式的に示す。候補産物、情報検索および製品開発により、製品使用のための植物源が同定され、知的財産の位置付けおよび市場の利点に関する推奨が得られる。製造プロセス開発、および、パイロット規模プロトタイプ製品の製造に続き、効率および安全性プロファイルの確認が行われる。臨床試験がうまくいくことや、最終産物の発売をもって、Phytologix™ プロセスの完了とする。

【図26】図26は、重要なタスクのチェックリストを示し、これは、重要な活性の経過を追い、データ作製を続けるために、Phytologix™ プロセスで利用することが可能である。

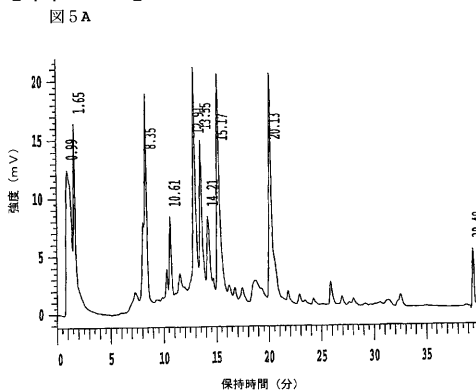
【図27】図27は、Phytologix 基盤における、時間、コスト見積もり、および意思決定法を示す。該図は、フルタイムの従業員の必要性、ならびに、発見および開発の各段階でかかる時間およびコストを示す。これは、プロジェクトマネージャーに、重要な意思決定ポイントそれぞれにおけるプロジェクトの進行を評価する機会を与える。

10

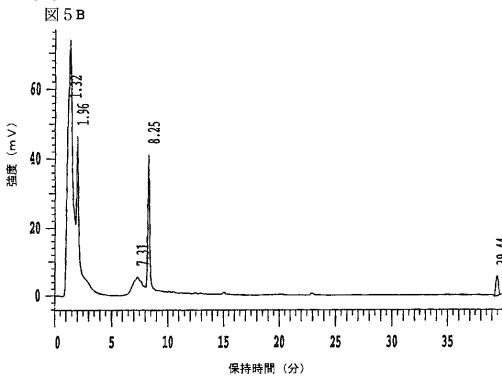
【図1】

ラテン名 : <i>Delonix elata</i> (Linn.) Gamble				UPI# P0700		
地方名 : Tiger bean, White gulmohur				ファミリー: <i>Caesalpinaceae</i>		
分布 : 荒れた土地の街路樹				関連種 : <i>Delonix regia</i>		
				植物部分 : 花		
インド 収集						
コレクター		場所		日付	証票	
Mr. Yadagtri		国 India 州 Hayatnagar 村 Hyderabad		緯度 17° 標高 78' 標高 675 mts	17.01.01 266	
THERAPEUTICS 治療						
民族学的指標		用いられた植物部分	調製モード/投与	投与量		
花: 気管支炎、喘息およびマラリアにおいて処方される煎じ液		花	花の煎じ出し	-		
植物同定						
説明		肉眼観察	顕微鏡観察	同定元		
中型の木; 柔毛のある枝		葉は、2枚の羽状であり; 小葉は、15~22枚の対になった、無毛で、やや無茎状の、細長い楕円形で、常緑性である。花は、黄色がかった白色であり、葉腋において花序の輪状花序であり、丈夫な小花柄である。萼片は、5個で、ほとんど密着して弁状である。花弁は、5個で、黄色がかった白色で、短い爪を持ち、縁が裂けている。おしべは、10本で、環状しており、基部で花糸が厚くなっており、葯は圓錐状である。小柄は、散花で覆われている。果は、半球状であり、縁が鋭角である。外殻は、かなり滑らかであり、灰色である。木は、黄色がかった白色である。	-		Dr. P. Padma Rao, Associate Botanist, Drug Standardization Unit, Hyderabad	
化学成分 : 黄色の花は、クエルセチン、ルチン、β-シトステロール、ルベオール、没食子酸および糖に加えて、ミリセチン、その3-オラムノシドを含む。花柄は、ゼアザンチンの豊富な源である。						
薬理学および毒性 :						
参考文献 : 1. Chem. Ind., 1970, 534; Curr. Sci., 1976, 45, 661. 2. Biochem J. 1966, 101, 250. Chem. Compn. Of yellow and red flowers Curr. Sci. 1967, 36, 376.						

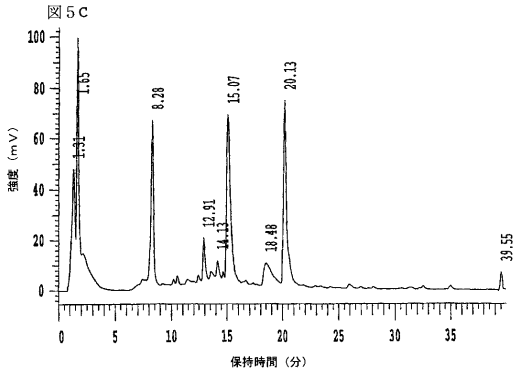
【図5A】



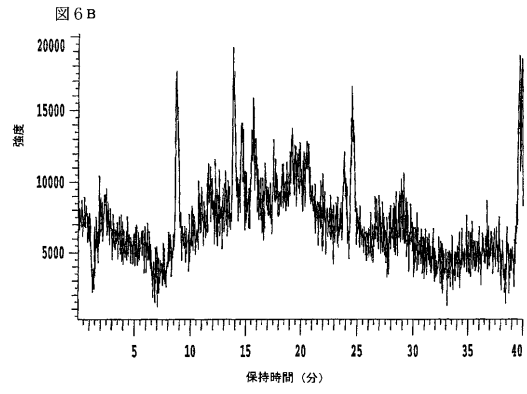
【図5B】



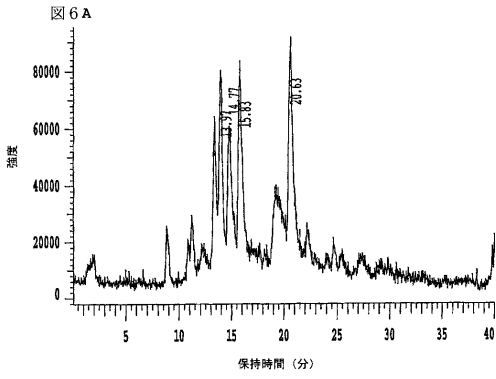
【 5 C 】



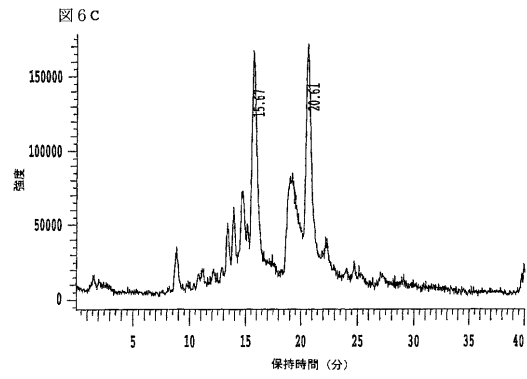
【 6 B 】



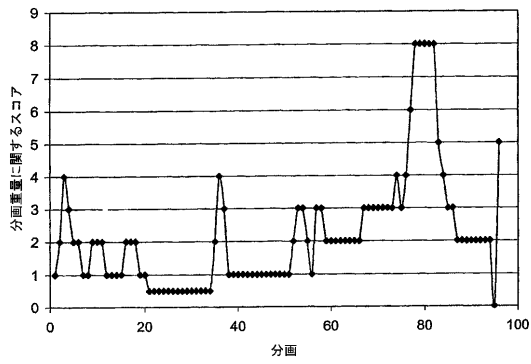
【 6 A 】



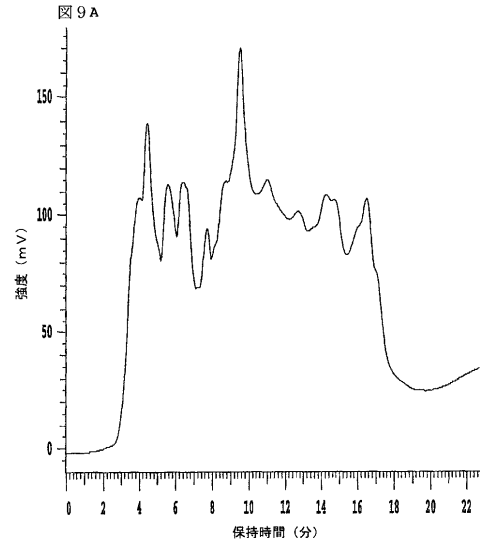
【 6 C 】



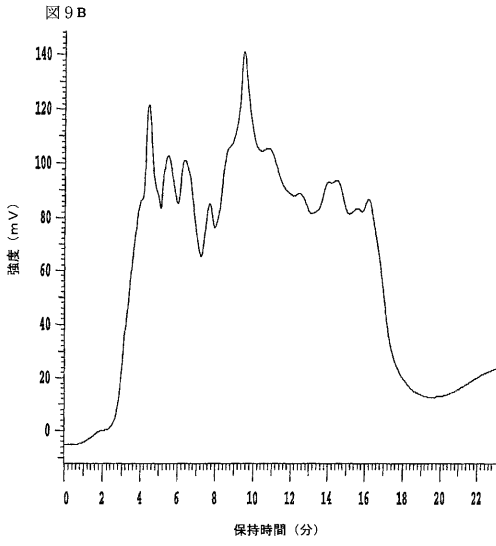
【 8 】



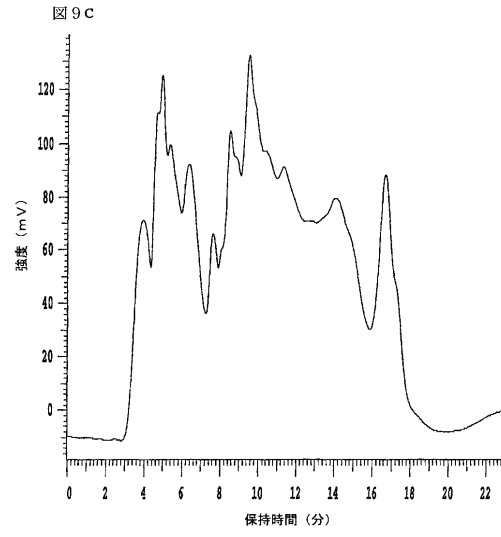
【 9 A 】



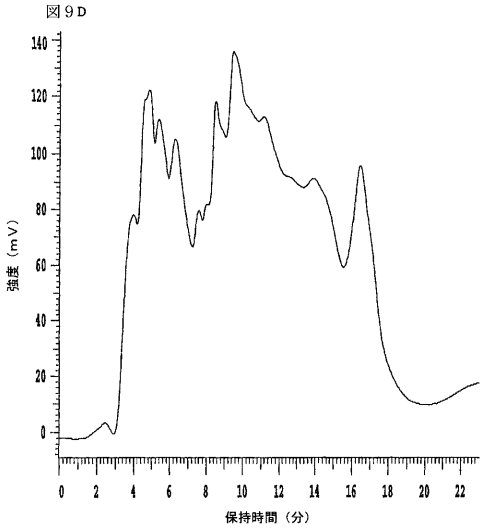
【 9 B】



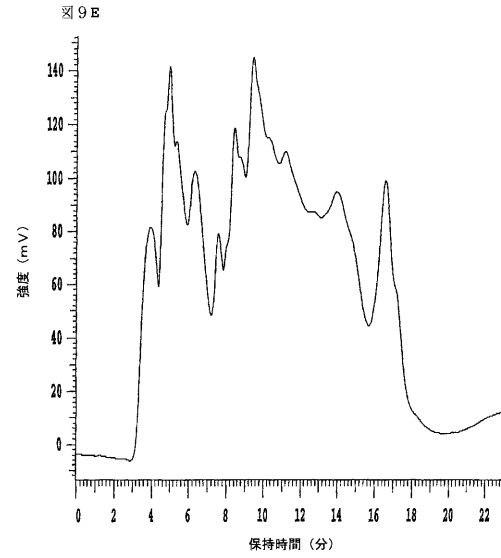
【 9 C】



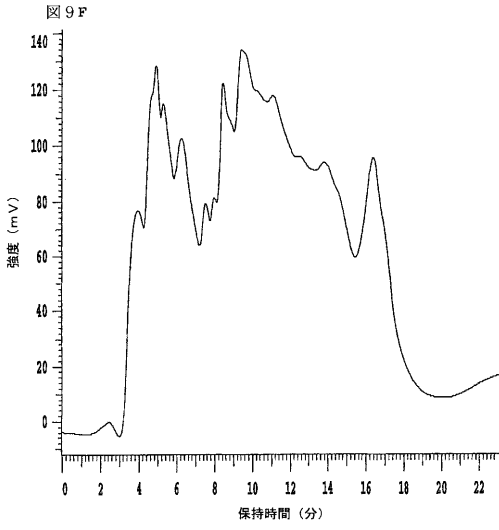
【 9 D】



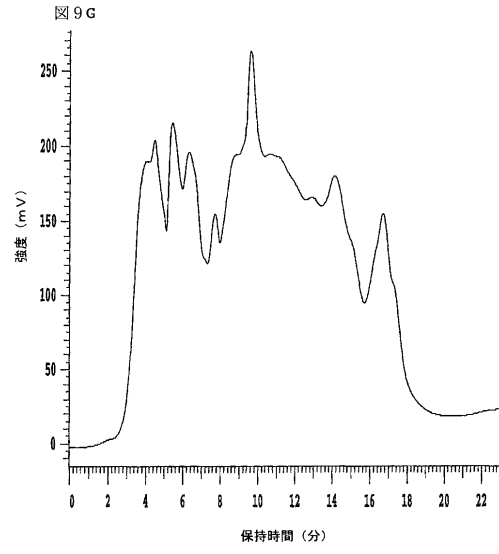
【 9 E】



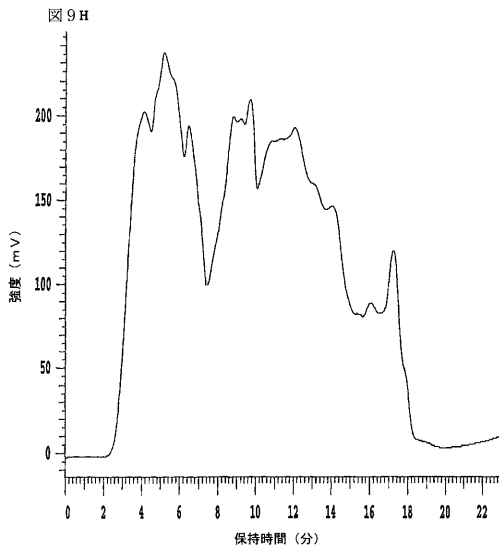
【 9 F 】



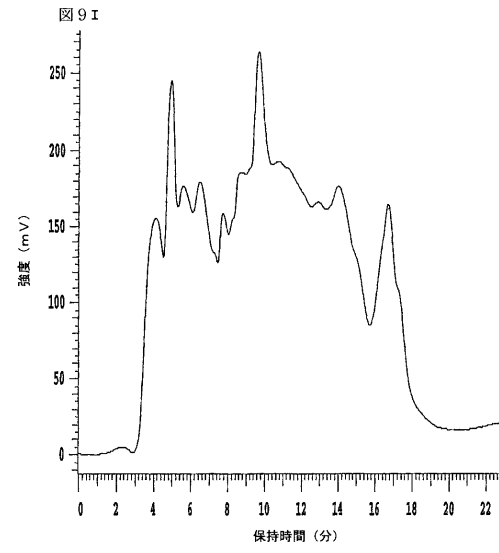
【 9 G 】



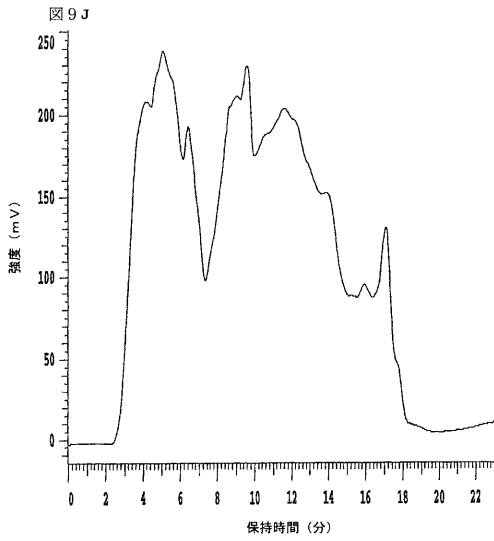
【 9 H 】



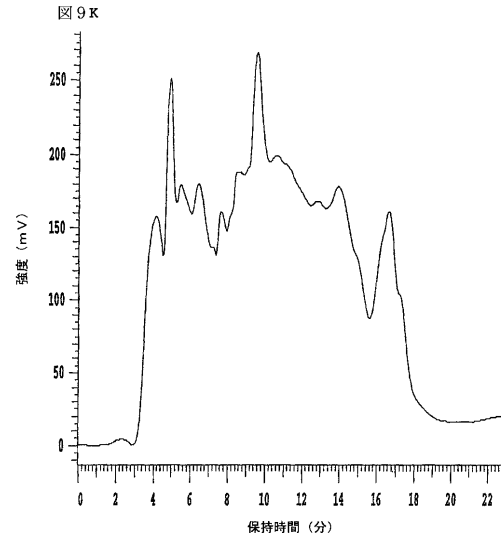
【 9 I 】



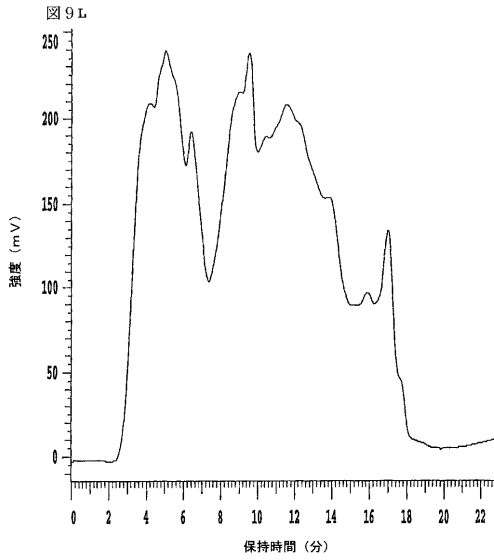
【 9 J 】



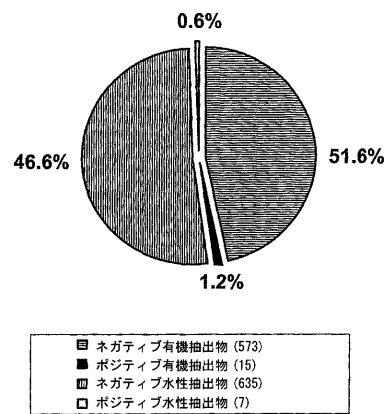
【 9 K 】



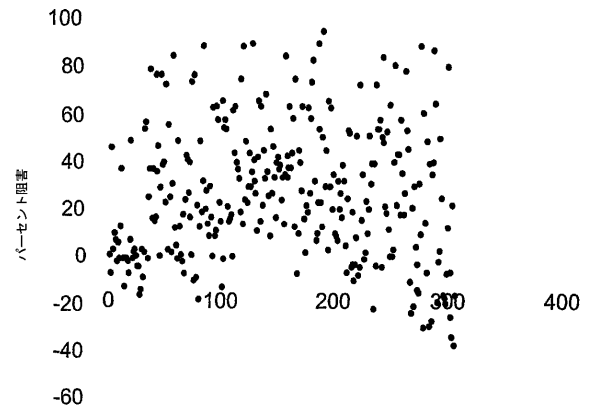
【 9 L 】



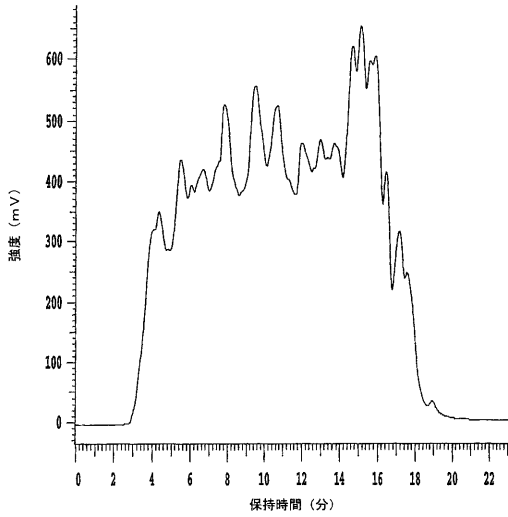
【 1 0 】



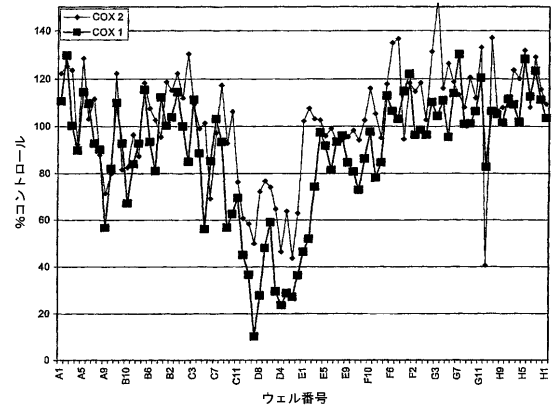
【 1 1 】



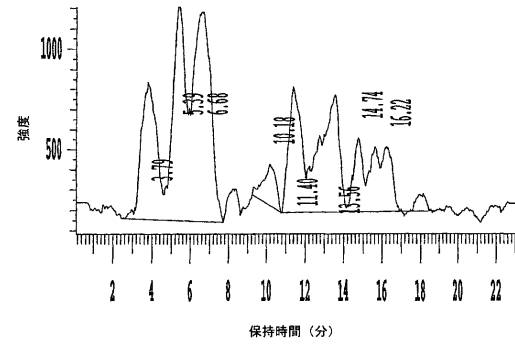
【 1 2 】



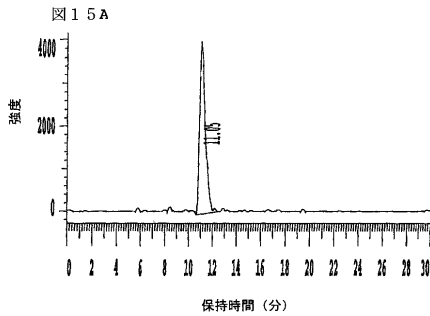
【 1 3 】



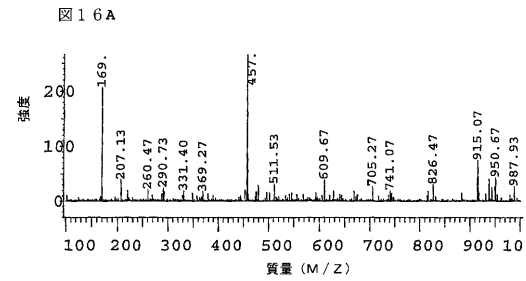
【 1 4 】



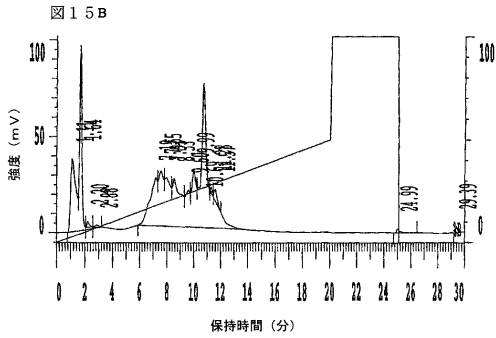
【 1 5 A 】



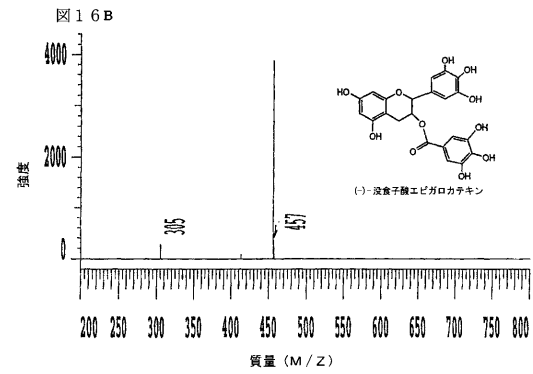
【 1 6 A 】



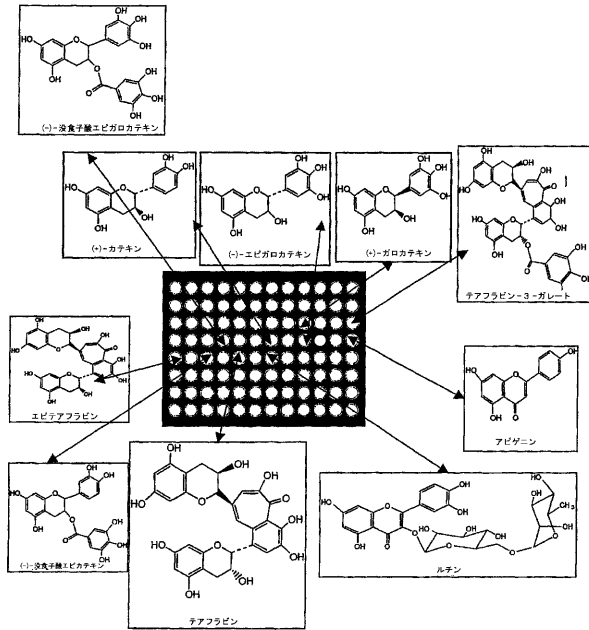
【 1 5 B 】



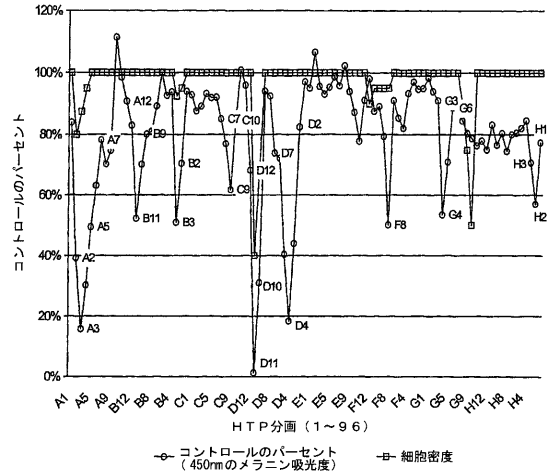
【 1 6 B 】



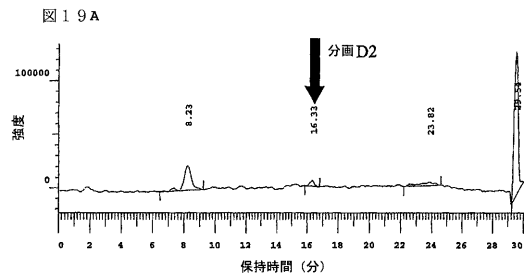
【 図 17 】



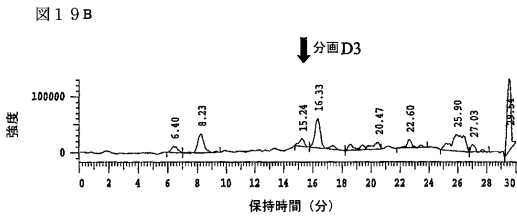
【 図 18 】



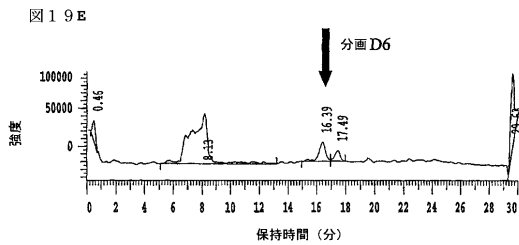
【 図 19 A 】



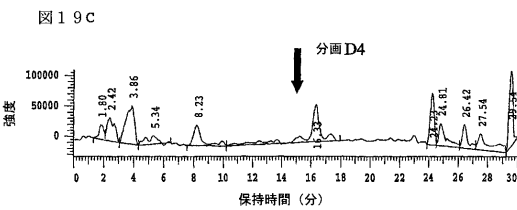
【 図 19 B 】



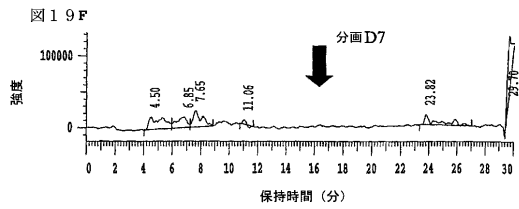
【 図 19 E 】



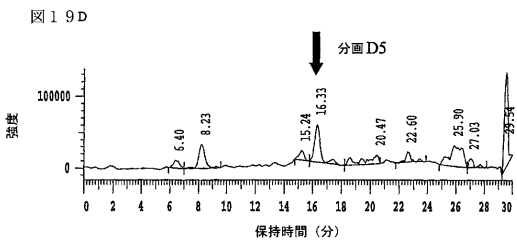
【 図 19 C 】



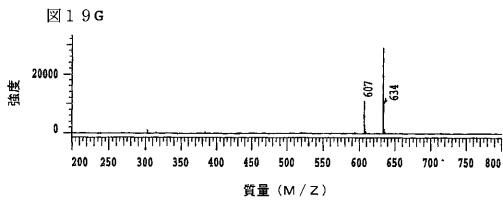
【 図 19 F 】



【 図 19 D 】



【 図 19 G 】



【 図 19 H 】

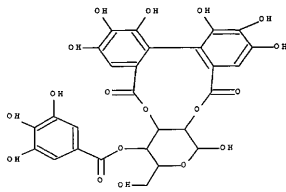
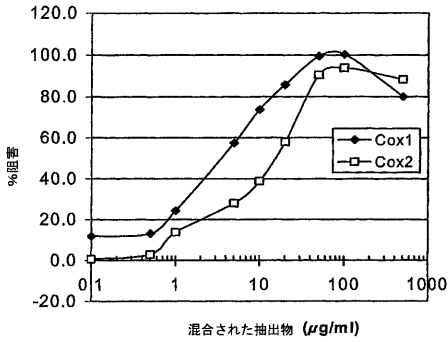
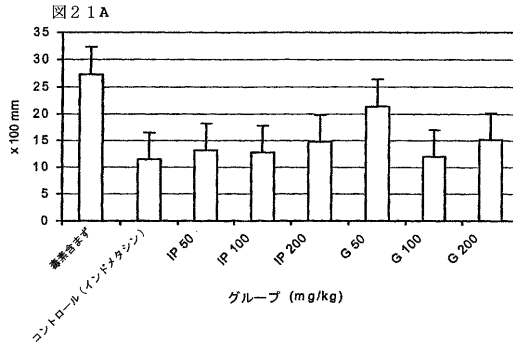


FIG. 19H

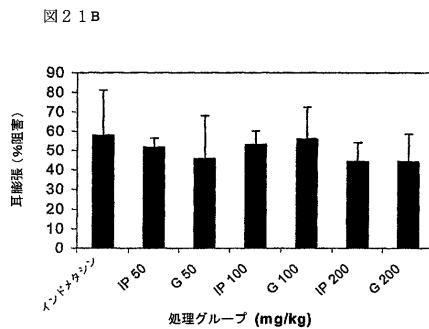
【 図 20 】



【 図 21 A 】



【 図 21 B 】



【 図 23 】

分析証明書

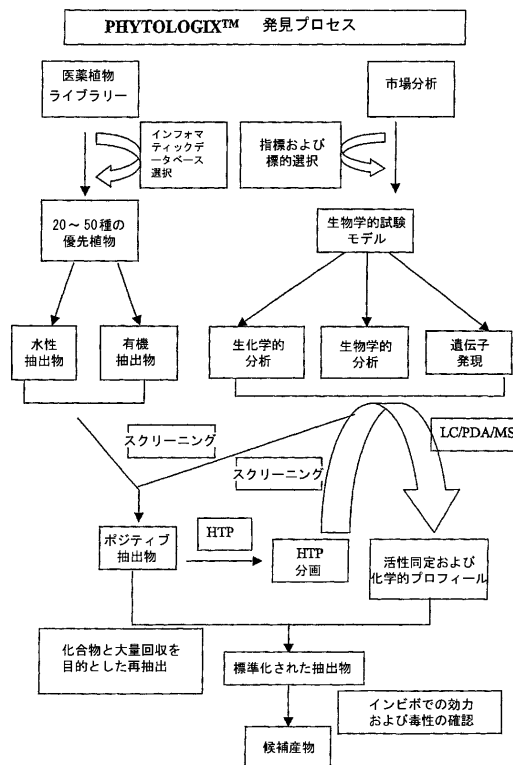
製品: Univestin™
 製品コード: UP446
 起源: 標準化した遊離B環フラボノイドおよびフラバンが主成分の混合物
 ロット番号: 042602COX-2
 製造年月日: 042602

試験	明細	結果
1. 色および外観	黄色粉末	黄色粉末
2. 遊離B環フラボノイド	NLT 60%	62.7%
3. フラバン	NLT 10%	12.2%
4. 湿気	NMT 5%	3.8%
5. 粒度	NLT 90% (80メッシュを通過)	93.2%
6. 重金属	NMT 10ppm	Pass
7. ヒ素	NMT 10ppm	Pass
8. 総大腸菌数	検出されず	Pass
9. 好気性菌のプレート上の数	NMT 10,000 cfu/g	Pass
10. カビおよび酵母	NMT 1,000 cfu/g	Pass

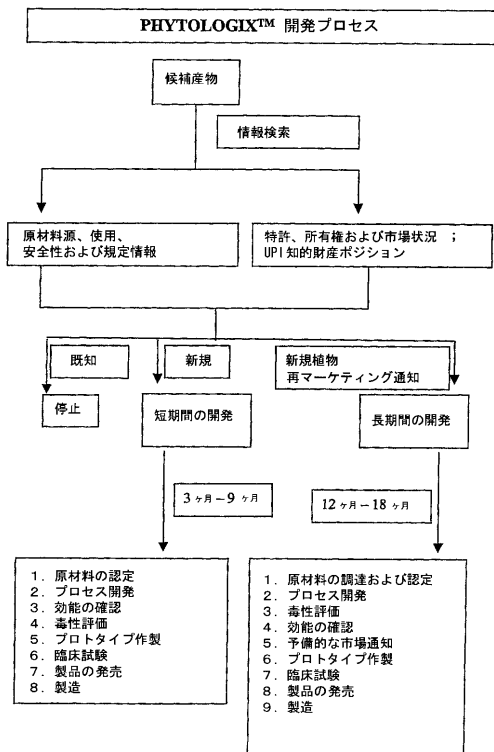
これは、この製造ロットの製造で用いられた材料から得られた分析結果の、本物の正確な写しである。

署名: Susan Vance
 日付: _____
 Quality Assurance

【 図 24 】



【 図 2 5 】

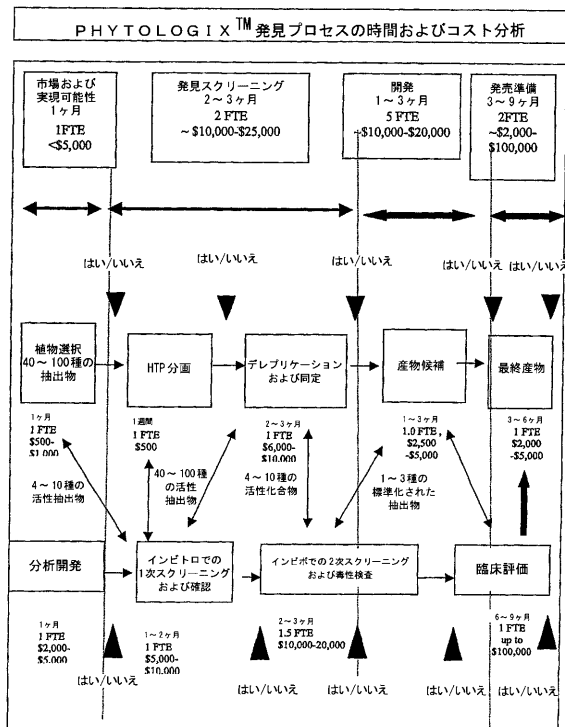


【 図 2 6 】

PHYTOLOGIX™ タスクチェックリスト

市場および情報収集					
市場調査	製品概念	指標	作用機序	インフォマティク検索	競合相手の分析
実現可能性調査					
植物選択	植物抽出	インビトロモデル	分析確認	コスト分析	抽出物スクリーニング
スクリーニングおよび発見					
ヒット確認	HTP 分画化	スクリーニング HTP 分画	活性デレプリケーション	大規模単離	活性同定
製品開発					
活性物質の IC ₅₀	二次分析	インビトロ毒性	標準化された抽出物	文献検索	規制および IP 評価
製品評価					
効能確認	インビボ毒性	QC 方法開発	原料調達	原料認定	プロセス開発
発売準備					
プロトタイプ作製	安定性研究	ヒト臨床	マーケティングプロフィール	特許出願	公開プレゼンテーション
発売					
原料供給	MFG 製造	ヒト臨床	品質および効能の保証	製品広告	公的な関係

【 図 2 7 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
9 January 2003 (09.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/002134 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 35/78, C12Q 1/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/20602
- (22) International Filing Date: 27 June 2002 (27.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 50/201,523 27 June 2001 (27.06.2001) US
- (71) Applicant: UNIGEN PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; Suite 160, 100 Technology Drive, Broomfield, CO 80021 (US).
- (72) Inventors: JIA, Qi; 477 Jasper Way, Superior, CO 80027 (US). HONG, Mei-Feng; 1228 West 111th Avenue, Northglenn, CO 80234 (US).
- (74) Agents: SWANSON, Barry, J. et al.; Swanson & Bratschun, L.L.C., Suite 330, 1745 Shea Center Drive, Highlands Ranch, CO 80129 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



(54) Title: METHOD FOR GENERATING, SCREENING AND DEREPICATING NATURAL PRODUCT LIBRARIES FOR THE DISCOVERY OF THERAPEUTIC AGENTS

(57) Abstract: The present invention relates generally to a technology platform, referred to as Phytolix™ for the discovery of novel bioactive pharmaceutical, nutraceutical and cosmetic agents. Specifically, this invention includes an integrated system for the collection of medicinal plants and creation of informatic databases related to these plants. This invention also relates to an improved standardized extraction and fractionation process, which provides significant advantages over the prior art in the terms of simplicity, efficiency of the separations, the quality of the library, low cost of the process and extraordinary throughput. This invention provides details to the structure dereplication process by utilizing the technology such as HPLC/PDA/MS coupled with high throughput bioassay data and an internal pure compound library. It has been proven to be much more efficient and accurate when compared to the prior art methods. Finally, the Phytolix™ platform has been approved as a realistic and efficient process by the determination of the whole process of discovery and development of natural COX-2 and tyrosinase inhibitors as novel nutraceutical and cosmetic products.

WO 03/002134 A1

WO 03/002134

PCT/US02/20602

METHOD FOR GENERATING, SCREENING AND DEREPlicATING NATURAL PRODUCT LIBRARIES FOR THE DISCOVERY OF THERAPEUTIC AGENTS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to a technology platform, referred to as PhytologiTM, for the discovery and development of novel bioactive pharmaceutical, nutraceutical and cosmetic agents. The invention provides details on bioprospecting and informatics, parallel and preparative purification technology, online (HPLC/UV/MS) and offline (HPLC/PDA/MS) dereplication, high throughput bioassay technology, a computerized database search strategy, and a conventional approach to product development in the pharmaceutical, nutraceutical and cosmetic fields.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Natural products have not only formed a scientific basis for the traditional use of medicinal plants, but have also played an important role in modern medicine. (Newman *et al.* (2000) *Nat. Prod. Rep.* 17:215-234). Based on a review of drugs approved between 1983 and 1994, drugs of natural origin contributed to 78% of the antibacterial drugs, 75% of platelet aggregation inhibitors, 61% of anticancer drugs, 48% of anti-hypotensive drugs, 47.6% of antiulcer drugs, and 32.5% of the anti-inflammatory drugs approved. (Cragg *et al.* (1997) *J. Nat. Prod.* 60:52-60). However, analgesic, antidepressant, antihistamine, anxiolytic, cardiotonic, antifungal agents and hypnotic drugs are primarily synthetic in origin.

Natural products have been demonstrated to be highly diversified structural resources for the discovery of potential drug leads. There are over 169,000 known natural products. (The Combined Chemical Dictionary, Chapman and Hall/CRC, version 10:2 Feb. 2002). Based on the analyses of 10,495 natural products and 5757 trade drugs, it was discovered that natural products possess 1748 different ring systems, which is two times more diverse than the 807 different ring systems found in trade drugs. (Lee and Scheneider (2001) *J. Com. Chem.* 3:284-289). Approximately 35% of the ring systems found in trade drugs are also found in natural products, however only 17% of the ring systems found in natural products have an identical counterpart in trade drugs. Natural products are not only functional as structural leads, but also have very similar architecture and pharmacophoric properties as those of trade drugs (Lee and Scheneider, (2001) *J. Com. Chem.* 3:284-289; Bemis and

WO 03/002134

PCT/US02/20602

2

Murcko (1996) *J. Med. Chem.* **39**:2887-2893). In a comparison of 10,495 natural products with 5757 trade drugs, it has been found that the average calculated molecular weight of natural products is almost identical to that of trade drugs (356 vs. 360); and the average log p values are slightly higher for the natural products (2.9) than for trade drugs (2.5). Natural products have fewer hydrogen donors per molecule and fewer nitrogens per molecule than trade drugs; have a much higher number of bridgehead atoms than trade drugs and synthetic drugs; and have many more chiral centers per molecule (Henkel *et al.* (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**:643-647). However, both natural products and trade drugs have a similar average number of oxygens per molecule and the same percentage of compounds with at least two "rule-of-5" violations. (Lipinski *et al.* (1997) *Adv. Drug Delivery Rev.* **23**:3-25).

With the advancement of new technology, such as combinatorial syntheses, computational drug design and super high throughput screening, there has been an increasing interest in the design of small molecule libraries using natural products as templates. (Hall *et al.* (2001) *J. Combinatorial Chem* **3**(2):125-150; Wang and Ramnarayan (1999) *J. Comb. Chem.* **1**:524-533). Combinatorial libraries can be generated in solution, however, most of the libraries generated to date rely on solid-phase synthetic techniques, including solid-phase extractions, which are used predominantly in the purification of the targeted synthetic compounds. (Desai *et al.* (1994) *Drug Devel. Res.* **33**:174-188). Unfortunately, there are significant limitations in the synthetic approach to generating libraries from complex natural product templates, particularly with compounds containing multiple-rings and multiple chiral center skeletons. An obvious limitation, for a semi-synthetic approach is that certain skeletal modifications and crucial functional group positions can not be diversified. To date, all published compound libraries have been generated using collections of starting materials and a certain reaction or reaction sequence that must be optimized under specific conditions. (Weber (2000) *Current Opinion in Chem Biol.* **4**:295-302). Additionally, to develop a synthetic library from a known natural product lead, requires a significant amount of information regarding the relationship between structure and activity to define the potential sites on the natural product template that could be modified. Thus, the general approach to combinatorial synthetic chemistry involves the identification of a specific type of natural product based upon available pharmacological profiles and the dissection of structures into scaffolds or templates.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

3

The design of focused natural product libraries has its roots in combinatorial synthesis and computational chemistry. (Wessjohann (2000) *Current Opinion in Chem Biol.* 4:303-309; Kolb (1998) *Prog. Drug Res.* 51:185-217). Efforts have been made to design specific types of libraries that target specific types of compounds (Stahura *et al.* (2000) *J. Med. Model* 6:550-562), that focus on specific therapeutic targets or that include bioavailability as a criteria (Shu (1996) *J. Nat Prod.* 61:1053-1071). Many different types of natural product templates have been developed and natural product libraries have been successfully generated, including alkaloid like libraries, from compounds such as, benzylamines (Green (1995), *J. Org. Chem.* 60:4287-4290), quinazolines (Wang and Ganesan (2000) *J. Comb. Chem.* 2:186-194), indoly diketopiperazines (Loevzizjin *et al.* (1998) *Tetrahedron Lett.* 39:4737-4740), mappicine analogues (Josien and Curran (1997) *Tetrahedron* 53:8881-8886), yohimbine analogues (Ni *et al.* (1996) *J. Med. Chem* 39:1601, Atuegbu *et al.* (1996) 4:1097-1106) and oligoheterocycles (Boger *et al.* (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122:6382-6394); and flavonoid like libraries, from compounds such as, flavone analogues (Marder *et al.* (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 249:481-485), and benzopyrans (Nicolau *et al.* (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122:9939-9976, Mason *et al.* (1999) *J. Med. Chem.* 42:3251-3264).

Synthetic libraries generally contain purified single compounds in a quantity of 1-2 mg, with a purity of approximately 70-80% based on HPLC. Due to the co-existence of other chemical components resulting from the synthetic processes, the biological screening assays may be significantly impacted by false positives, false negatives and other complications. Designing a combinatorial library demands careful optimization of reaction selectivity and efficiency to avoid low yield, difficulty of purification and loss of chiral centers. It has been demonstrated that a specific, desirable biological property of a natural product can be improved even with rather small libraries integrating simple functional group modifications. (Hall *et al.* (2001) *J Combinatorial Chem.* 3(2):125-150). To date, there are few reports of the use of combinatorial libraries in the agriculture and food industries (Wang and Rebutson (1999) in *Chemicals Via Higher Plant Bioengineering*, Shahidi ed., Kluwer Academic/Plenum Publ. Pp 91-105). Additionally, there are no reports on the application of such libraries in the dietary supplements and cosmetics industries.

Grabley *et al.* have published an extensive review on the discovery of drugs from natural product-based libraries. (Grabley *et al.* (2000) *Ernst Schering Res. Found Workshop*

WO 03/002134

PCT/US02/20602

4

32:217-252). The screening of natural products typically begins with crude extracts. Specifically, the biomass of the plant is extracted multiple times with multiple solvents, which are typically chosen based upon their polarity. Unfortunately, these crude extracts contain large numbers of compounds, which are present in low concentrations. This typically results in the identification of biological activity resulting from the major components only. Compounds with potent activity, but present in concentrations below the detection limits may be missed altogether. Additionally, this may lead to false positive results, due to synergistic effects from similar weakly active components, or to non-specific interference from common components.

To date, there have been few reports of methods to generate natural product libraries directly from natural sources that are suitable for high throughput screenings and product discovery. One such method, was recently reported by Gary *et al.* (2000) WO 00133193. The method of Gary *et al.* comprises the steps of (a) thoroughly extracting a biological source material with alcohol/water or hexane followed by alcohol/water; (b) removing bioassay interferences from the solvent extracts by elution of the extracts through a polyamide column, (c) subjecting the eluent from the polyamide column to a solid phase extraction process with step gradients to collect limited fractions (typically 4); (d) further purifying each of these fractions by HPLC to generate the compound library based on detecting the bioactive compounds; and (e) collecting purified compounds with standardized concentrations generated by an automated system. This methodology has several drawbacks. First, the use of mixtures of alcohol/water as an extraction solvent will not extract all potential biologically active components from the biomass. A good example is polysaccharides, which will not dissolve in alcohol/water and therefore, would not be extracted from the plant biomass. However, polysaccharides are a very important class of natural products having known immune regulatory and anti-tumor effects and have been used in the pharmaceutical, nutraceutical and cosmetic industries. Second, polyphenol and tannins are biologically active ingredients (Kolodziej *et al.* (2001) *Planta Med.* 67:825-832; Abe *et al.* (2001) *J. Nat. Prod.* 64:1010-1014) that contribute to the efficacies of many popular herbal products, such as EGCG and other catechin and phenolic compounds from green teas, (No *et al.* (1999) *Life Sci.* 65:PL241-246), grape seeds and grape skins (Cantos *et al.* (2001) *J Agric Food Chem.* 49:5052-8). Removal of these components from plant extracts using the method described by

WO 03/002134

PCT/US02/20602

5

Gary *et al.* will result in a significant loss of bioactive components that have been demonstrated to be efficacious and valuable in the prevention and treatment of diseases. Third, the process disclosed by Gary *et al.* is a time consuming and expensive process, requiring the use of multiple solid phase extractions and column chromatography to generate the final compound library. Finally, the inventors emphasize the known concentration and structure information for each well before understanding the potential biological profile or value. Such efforts will also be very expensive and time consuming to analyze, sort and store.

A collaborative project, designed to generate a non-redundant pure compound library with a collection of 6,700 chemical entities in a quantity of ≥ 5 mg and a purity of $\geq 80\%$, was reported by Bindseil *et al.* (*Drug Discovery Today* 6: 840-847 (2001)). The biomaterials consisted of 679 species of plants, 2665 bacterial strains and 1425 fungal strains. The biomaterials were pre-screened before extraction for non-ubiquitous secondary metabolisms using HPLC/ELSD/DAD and LC/MS. The isolation was then carried out via flash column chromatography and the structural information was collected and the full structure of 400 randomly selected compounds was determined. The structure dereplication procedures included a search referenced retention times and molecular weights based on LC/MS data and comparison with a commercial database (*Dictionary of Natural Products*). 2D- NMR and other techniques were utilized to further define substructures and provide full structural elucidation. The pure compound library generated from the above method has been screened against nine different targets and has been shown to be superior to synthetic libraries with regard to response rates and confirmation rates.

Stewart *et al.* have reported on the efforts at Molecular Nature Ltd to generate a pure natural product library. (Stewart *et al.* (2000) *Saponins, in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants*, Oleszek and Marston (eds.) pp. 73-77). Compounds for this library were isolated utilizing parallel normal phase column chromatography, followed by C-18 and/or ion exchange chromatography. To be accepted into the library the compounds must be $> 90\%$ pure with structural verification by a combination of HPLC, NMR, MS and GC/MS. A method to make a secondary metabolite library from a microbial culture broth was reported by Schmid *et al.* (*J. Biomol. Screening* 4:15-25 (1999)). The library was generated using a novel automated process based on multistep fractionation of a supernatant from broth through

WO 03/002134

PCT/US02/20602

6

an Amberlite XAD-16 column, followed by chromatographic column fractionations with a styrene-divinylbenzene resin, reverse phase C-8 and C-18 and other types of solid phase extractions (SPE). This effort led to higher purity compounds in each fraction based on an automatic procedure with limited manual intervention. However, this method has several limitations. For example, SPE uses step-gradients that lead to limited fraction numbers in large volumes, and it is not a suitable method to collect fractions in a 96-well format. Finally, Dr. Kingston has disclosed the generation of a natural combinatorial library for anticancer drug discovery. (Kingston (2001) *Abs. Papers Amer. Chem. Soc.* 221:ORGN 199; (1997) *Abs. Papers Amer. Chem. Soc.* 214: AGRO124).

Technological development in genomics, enzymology and bioengineering has resulted in a method for generating natural products utilizing combinatorial biosynthesis. (Khosla (2000) *J. Org. Chem.* 65: 8127-8133, Hutchinson (1998) *Current Opinion Micorb.* 1: 319-329). For example, multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase have produced a novel unnatural natural product library. (McDaniel (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1846-1851). Combinatorial biosynthetic libraries have been constructed by cloning large fragments of DNA isolated from soil into a *Streptomyces* host (Wang et al. (2000) *Org. Lett.* 2:2401-2404), and through the glycosyltransferase catalyzed transformation (Thorson et al. (2001) *Abst. Papers Amer. Chem. Soc.* 221:Carb 19).

Recent developments in high throughput purification, LC/PDA, LC/MS/MS and LC/NMR for online structure dereplication and creation of informatic databases have fundamentally changed the way in which bioactive natural products are studied. The primary goal of dereplication is to identify known compounds from active extracts or fractions to avoid unnecessarily isolating these known compounds. The selection of an adequate structure database to evaluate information collected is critical to the dereplication process. (Corley and Durlley (1994) *J. Nat Prod.* 57:1484-1490). Chemical Abstracts Service's Registration File, which includes CA, NAPROLERT, REGISTRY, BEILSTEIN, MEDLINE etc. sub-databases and the Dictionary of Natural Products, which includes the Bioactive Natural Product Database and DEREPA databases are two of the most comprehensive databases

Dereplication of active crude extracts using HPLC/UV/MS, coupled with biological activity data obtained on subfractions was reported by Cordell and Shin. (*Pure Appl. Chem.* 71:1089-1094(1999)). In this study, active plant extracts were analyzed using a HPLC C-18

WO 03/002134

PCT/US02/20602

7

column eluting with an acetonitrile/water gradient in 30 minutes with single wavelength UV detection and ESI-MS in a positive and negative dual mode. The UV absorption properties, molecular weight and ion fragmentation information from ion chromatograms (ELC) of extracts were analyzed using NAPRALERT and the Dictionary of Natural Products. LC-ESI-MS technology was also utilized for quantitatively differentiating crude natural extracts as described by Julian *et al.* (1998), *Anal. Chem.* 70:3249-3254. Briefly, ethanol/water extracts from fungal cultures were separated on a dual-column HPLC system with C-18 columns in 25 minutes using an acetonitrile/water/ammonium acetate gradient. A Similarity Index was based on the HPLC retention time and mass to charge ratio from the positive ion mode of an ESI-MS instrument. This methodology, however, was restricted to a qualitative result with limited structural information and limited types of compounds that give a reasonable molecular ion peak in the positive mode. As demonstrated by Wolfender's report (Wolfender *et al.* (1995) *J. Mass Spectr. Rapid Commun. In Mass Spectr.* S35-S46), there is no single ionization interface allowing the optimum ionization of all the secondary metabolites within a single crude plant extract. Different ionization techniques, such as ES, APCI, TSP or CF-FAB are required in conjunction with LC/DAD and MS/MS. To generate a searchable library of MS/MS fragmentation spectra with reliable reproducibility it is very helpful to expand the structural information collected from mass spectrometry. (Baumann *et al.* (2000) *Rapid Commun. In Mass Spectr.* 14:349-356).

Bradshaw *et al.* have disclosed a rapid and facile method for the dereplication of a purified natural product library. (Bradshaw *et al.* (2001) *J. Nat. Prod.* 64:1541-1544). The method involves searching a text file that links each structure with its molecular weight from LC/MS and an exact count of the number of methyl, methylene and methane groups derived from NMR data. The search uses customized software with chemical structure information in a specific format - SMILES which has been converted from commercial databases.

The chemical structure of natural products can be identified quickly, with a limited amount of materials by utilizing NMR equipment containing cryo probes (Russell *et al.* (2000) *J. Nat. Prod.* 63:1047-1049). More predictable chemical shifts, coupled with a reasonable amount of published and internal NMR data (Smith *et al.* (2001) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41:1463-1469) will significantly improve the time and accuracy of the structure elucidation process (Patchkovskii and Thiel (1999) *J. Computational Chem.* 20:1220-1245;

WO 03/002134

PCT/US02/20602

8

Grzonka and Davies (1998) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **38**:1096-1101; Schütz *et al.* (1997) *Fresenius J. Anal. Chem.* **359**:33-41). Additionally, the direct coupling of HPLC with NMR and mass spectrometry (MS) provides much more structural information and significantly enhances the quality of the conclusions in the dereplication process (Lindon *et al.* (2000) *J. Chromatogr. B* **748**: 233-258).

The development of high throughput screening technology began in the mid 1980's. Robotic operation coupled with laboratory information management systems, in combination with miniaturized signal reading systems, enable the throughput screening of literally millions of samples per assay per annum (Lin (1995) *J. Food & Drug Anal.* **3**:233-242). Natural product libraries have been screened against a variety of biological (Virador *et al.* (1999) *Analytical Biochemistry* **270**:207-219), biochemical (Noreen *et al.* (1998) *J. Nat. Prod.* **61**:2-7) and genomic targets (Ghai (1999) U.S. Patent No. 5,955,269). Display cloning technology has been developed for functional identification of natural product receptors using cDNA-phage display (Sche *et al.* (1999) *Chem Biol.* **6**:707-716).

Inhibition of the enzyme cyclooxygenase (COX) is the mechanism of action attributed to most nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). There are two distinct isoforms of the COX enzyme (COX-1 and COX-2) that share approximately 60% sequence homology, but differ in expression profiles and function. COX-1 is a constitutive form of the enzyme that has been linked to the production of physiologically important prostaglandins, which help regulate normal physiological functions, such as platelet aggregation, protection of cell function in the stomach and maintenance of normal kidney function. (Dannhardt and Kiefer (2001) *Eur. J. Med. Chem.* **36**:109-26). The second isoform, COX-2, is a form of the enzyme that is inducible by pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β) and other growth factors. (Herschmann (1994) *Cancer Metastasis Rev.* **13**:241-56; Xie *et al.* (1992) *Drugs Dev. Res.* **25**:249-65). This isoform catalyzes the production of prostaglandin E₂ (PGE₂) from arachidonic acid (AA). Inhibition of COX-2 is responsible for the anti-inflammatory activities of conventional NSAIDs.

Although, rheumatoid arthritis is largely an auto-immune disease and osteoarthritis is caused by the degradation of cartilage in joints, reducing the inflammation associated with each provides a significant increase in the quality of life for those suffering from these diseases. (Wienberg (2001) *Immunol. Res.* **22**:319-41; Wollheim (2000) *Curr. Opin. Rheum.*

WO 03/002134

PCT/US02/20602

9

13:193-201). In addition to rheumatoid arthritis, inflammation is a component of rheumatic diseases in general. Therefore, the use of COX inhibitors has been expanded to include diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE) (Goebel *et al.* (1999) *Chem. Res. Tox.* 12:488-500; Patrono *et al.* (1985) *J. Clin. Invest.* 76:1011-1018), as well as, rheumatic skin conditions, such as scleroderma. COX inhibitors are also used for the relief of inflammatory skin conditions that are not of rheumatic origin, such as psoriasis, in which reducing the inflammation resulting from the over production of prostaglandins could provide a direct benefit. (Fogh *et al.* (1993) *Acta Derm Venerologica* 73:191-3). Simply stated, COX inhibitors are useful for the treatment of symptoms of chronic inflammatory diseases, as well as, the occasional ache and pain resulting from transient inflammation.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates generally to a technology platform, referred to as PhytoLogix™, for the discovery and development of novel bioactive pharmaceutical, nutraceutical and cosmetic agents. The invention provides details on bioprospecting and informatics, parallel and preparative purification technology, online (HTP/UV/MS) and offline (HPLC/PDA/MS) dereplication, high throughput bioassay technology, a computerized database search strategy, and a conventional approach to product development in the pharmaceutical, nutraceutical and cosmetic fields. The method for discovering and developing novel therapeutic pharmaceutical, nutraceutical and cosmetic agents is comprised of the steps of: (a) identifying and collecting a biological sample; (b) extracting the sample using a two solvent system extraction procedure; (c) separating the extracts using two separate high throughput (HTP) fractionating methods and simultaneously determining the activity of each HTP fraction; (d) dereplicating the active fractions to identify the compounds present; and (e) generating an indication, pharmacological and safety profile for each novel compound from step (d). The sample can be selected from any natural source including, but not limited to materials of botanic, microbial, fungal, mineral, marine, animal and human origin. In a preferred embodiment the sample is a plant. Additionally, in a preferred embodiment the sample is pre-selected based upon documented traditional use or known medicinal property.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

10

A collection form is prepared for each sample collected. The collection form contains specific information about the sample including, but not limited to Latin name, distribution, collection location, therapeutic information, traditional preparations, botanical identification and published references. This information is then transferred to a database. Specific macros and queries are designed to assess this information and data stored.

After the sample is collected, at least two specimen vouchers are prepared for each sample, wherein said specimen vouchers are comprised of dried, and/or preserved naturally and/or chemically the whole body of the sample including the full reproduction organs and wherein a taxonomy form is attached to each voucher specimen for purposes of identification. The specimen vouchers are critical and unique to guarantee the integrity and authenticity of the sample during the research stage of the process and to ensure the potential of successful recollection and production during the production stage of the process.

The second and third steps of the Phytologix™ process include multiple standardized extraction and fractionation protocols that enable the generation of diversified crude extracts and a fraction library using a high throughput procedure. The solvent extraction procedure of step (b) comprises the steps of: (a) grinding an appropriate amount of sample; (b) extracting the ground sample with a combination of two organic solvents, wherein said combination is comprised of a solvent of low polarity and a solvent of high polarity; (c) drying the sample after organic extraction; (d) extracting the dried sample with an aqueous solvent; and (e) evaporating the solvent from both extractions and isolating the extract. The amount of sample extracted is typically between 1 gram to 1000 grams.

The low polarity used in the organic extraction step is selected from the group consisting of an alkane having 6-10 carbons, a halogenated alkane having 1-4 carbon atoms, wherein each carbon atom has 1-4 halogen atoms, an ester having the formula R'COOR", wherein R' is selected from an alkyl group having between 1-6 carbons and R" is selected from an alkyl group having between 1-8 carbons and a ketone having between 3-12 carbons. The low polarity solvent is selected from the group consisting of methylene chloride, ethyl acetate and chloroform. The high polarity solvent is selected from the group consisting of DMSO, THF and an alcohol, wherein said alcohol has one to eight carbons. In a preferred embodiment, the alcohol is selected from the group consisting of methanol, ethanol, propanols and butanols. The aqueous solvent is selected from the group including, but not

WO 03/002134

PCT/US02/20602

11

limited to, water, acidic water, basic water, or an aqueous buffer, wherein the pH is adjusted between one to fourteen. The extraction can be carried out using any method known in the art for extraction including, but not limited to, shaking, sonication, refluxing, stirring, and pressurized mixing, and filtering.

The extracts obtained from the extraction process are prepared for bioassay by (a) weighing and dissolving the organic extract into a solvent; (b) weighing and dissolving aqueous extract in a solvent; and (c) transferring each extract solution into individual cells of a sample master plate. The solvent for dissolving the organic and aqueous extracts are independently selected from the group of solvents including, but not limited to, DMSO, DMF, THF, ketones having three to ten carbons and alcohols having one to five carbons.

The extracts obtained are then separately fractionated using a parallel chromatography system or a high throughput purification (HTP) system by a method comprising the steps of (a) separating the organic extract with a normal phase pre-packed column; (b) separating the aqueous extract with a reverse phase pre-packed column; (c) detecting eluent with detector(s); (d) collecting fractions; and (e) evaporating the solvent. The chromatography/HTP is carried out at ambient, low, medium or high solvent pressure and at ambient, or a temperature from 20 to 80°C. The normal phase column is packed with a resin selected from the group consisting of silica gel, alumina, and amino propyl, cyano propyl, diol florasil or polyamide, ion exchange resins. The reverse phase column is packed with a resin selected from the group consisting of C-2, C-4, C-8, C-18, LH-20, XAD-4, XAD-16, and polystyrene-divinyl benzene based resins. The particle size of the resin in each chromatography column is from 10 to 200 μm and the chromatography column is packed with 1 to 500 grams of resin depending upon the amount of sample and difficulty of separation.

The normal phase chromatography column is eluted with a combination of three organic solvents selected from an alkane having six to ten carbons, an organic ester, having the formula R^1COOR^2 , wherein R^1 is selected from an alkyl group having between one to five carbon and R^2 is selected from an alkyl group having between one to six carbons, and an alcohol, having the formula R^3OH , wherein R^3 is an alkyl group having between one to six carbons. The reverse phase chromatography column is eluted with a combination of two solvents: deionized (DI) water and a solvent selected from the group consisting of an alcohol with one to four carbons, acetonitrile, THF, or a ketone having three to twelve carbons.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

12

The detector may be any detector used in the art for such purposes including, but not limited to an ultraviolet (UV)/visual light detector, a Mass Spectrometer (MS) detector, a Nuclear Magnetic Resonance (NMR) detector, a reflex index (RI) detector or a light scattering detector (LSD). The ultraviolet (UV)/visual light detector may be comprised of single or dual channels with single, continuing or broadband wavelength from 100 - 1000 nm. The MS detector may be comprised of an electronic spray ionization or sonic spray ionization chamber; ion trap or single or triple quadruple mass detection with positive or negative mode. The NMR detector may be comprised of a proton or carbon probe.

After HTP fractionation each of the fractions is tested for bioactivity. In a preferred embodiment the bioassay is performed simultaneously with the HTP fractionation. The method for preparing the individual fractions for bioassay comprises the steps of: (a) dissolving the fractions from organic extract into a solvent; (b) dissolving the fractions from aqueous extract into a solvent; and (c) transferring the fraction solution into a sample plate. The solvent for dissolving the fractions derived from the organic extract and the aqueous extract is independently selected from the group including, but not limited to DMSO, DMF, THF, a ketone containing three to ten carbons, an alcohol containing one to five carbons and a combination of two to three of solvents. Each fraction is then assayed using standard biochemical (enzymatic), functional or biological models as the primary screening method to identify extracts and compounds with a particular activity.

Once active botanical extracts and/or fractions, and/or compounds are identified as having a mechanism of action and/or a specific therapeutic value, chemical composition profiling and active component standardization will be carried out. Thus, once identified, the active fractions are subjected to a dereplicating process which comprises the steps of: (a) collecting activity data related to the sample; (b) collecting physical property, spectroscopic and structural data related to the sample; (c) analyzing the collected data; (d) searching commercial databases for the properties of the sample; and (e) reaching a conclusion regarding the composition of the active fractions.

The activity of the samples is measured using standard means including, but not limited to enzyme inhibition, receptor binding, gene expression, cell function regulation, protein production, animal function regulation and animal disease model manipulation and other measurements of biological function. The activity data can be collected from extracts,

WO 03/002134

PCT/US02/20602

13

fractions of extracts, purified compounds, semi-synthetic and synthetic compounds. Physical property data collected in the dereplication process includes, but is not limited to, retention time from a chromatogram based on absorption or changes of UV/VIS, refractive index, laser light scattering pattern, solvent elution volume, mass weight, pH, solubility and log P.

The spectroscopic information collected includes, but is not limited to, UV/VIS spectrum, mass spectrum including molecular ion and fragmentation ions, NMR spectrum and light scattering spectrum. Structural information is obtained from data such as mass fragmentation pattern and mass spectrum of daughter/grand daughter ions; chemical shifts of protons, carbons, phosphorous, and other elements from one and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopic data; infrared spectrum and UV absorption spectrum. The data collection process can be an online method by splitting a portion of eluent into a designated detector(s) and/or an offline process by analyzing individual samples after collected from the HTP separation. The data collected is then analyzed using various databases. Commercial databases that can be used include, but are not limited to the Dictionary of Natural Products, Chemical Abstracts Service's Registration File, NAPROLERT, MEDLINE, NERAC, DEREPA and the Bioactive Natural Product Database.

This process results in the dereplication of the composition in each fraction. If the composition is determined to be novel, further studies are carried out to generate an indication, pharmacological and safety profile for each novel natural product. If these results are positive the compound is then developed into a commercially viable product.

It is to be understood that both the foregoing general description and the following detailed description are exemplary and explanatory only and are not restrictive of the invention as claimed.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 illustrates a representative collection form submitted by medicinal plant collectors. The illustrative collection form covers information regarding plant origin, botanical identification, geographical distribution, ethno indications, chemical components and references.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

14

Figure 2 illustrates the tables and relationships of those tables in a database that covers all information about the plants, research data and publication references.

Figure 3 depicts the macros designed to draw information from the tables in the database in order to generate final reports based on specific queries.

Figure 4 illustrates a representative plant information overview on *Polygonum viviparum*, which includes botanical information, plant weights, extract weights and ethno indications.

Figure 5 depicts the HPLC/UV chromatograms of the organic extract (Fig. 5A), aqueous extract (Fig. 5B) and methanol extract (Fig. 5C) from the flowers of *Daphne genkwa* (P0490). There were no specific peaks present in the methanol extract that were not also present in either the organic extract or the aqueous extract.

Figure 6 depicts the HPLC/MS total ion chromatograms (TIC) of the organic extract (Fig. 6A), aqueous extract (Fig. 6B) and methanol extract (Fig. 6C) from the flowers of *Daphne genkwa* (P0490). There were no specific peaks present in the methanol extract which were not present in either the organic extract or the aqueous extract.

Figure 7 illustrates the separation efficiency of high throughput purification system on an organic extract from the roots of *Pulsatilla chinensis*. Every other HTP fractions were spotted and developed on a silica gel TLC plate and developed with 60% EtOAc in Hexane. The TLC plate was spread with coloration agent anialdehyde in sulfuric acid.

Figure 8 depicts the weight distribution of each HTP fraction in the 96-deep well plate collected from fractionation of the organic extract from the roots of *Pulsatilla chinensis*.

Figures 9A-9L illustrate the reproducibility of the high throughput purification system disclosed herein. Specifically, they depict 12 HTP/UV chromatograms from twelve reverse

WO 03/002134

PCT/US02/20602

15

phase C-18 column fractionations of the same aqueous extract isolated from the whole plant of *Ainsliaea henryi*.

Figure 10 illustrates the positive hit rate resulting from the screening of 1230 plant extracts for COX inhibitory activity. The positive hit rate was 1.2% positive for organic extracts and 0.6% for aqueous extracts. This screening resulted in the identification of 22 active plant extracts.

Figure 11 illustrates the tyrosinase inhibition distribution pattern of 396 organic extracts from various species of plants. A total of 36 plant extracts showed >60% inhibition of tyrosinase activity with 9.1% positive hit rate.

Figure 12 depicts the HTP/UV chromatogram of reverse phase fractionation of aqueous extract from the leaves of *Camellia sinensis* (P0605).

Figure 13 depicts graphically the inhibition of COX-1 (■) and COX-2 (◆) by various HTP fractions from the aqueous extract of the leaves of *Camellia sinensis* (P0605).

Figure 14 depicts the online PDA/MS base ion chromatogram (BIC) of bioactive HTP fraction D3, derived from an aqueous extract of the leaves of *Camellia sinensis* (P0605).

Figure 15 illustrates the HPLC/PDA chromatogram (Fig. 15A) and HPLC/MS total ion chromatogram (TIC) (Fig. 15B) from the off-line analysis of HTP bioactive fraction D3, derived from an aqueous extract of the leaves of *Camellia sinensis* (P0605).

Figure 16A depicts the identical mass spectra of HTP bioactive fraction D3 based on the data collection from on-line HTP/MS and off-line HPLC/MS. Figure 16B illustrates the results of the dereplication procedure described in Example 11. As can be seen in Figure 16B, fraction D3 contained a single known compound --Epigallocatechin gallate-- whose structure is set forth in the figure.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

16

Figure 17 depicts the results of dereplication of all 16 bioactive HTP fractions from the aqueous extract of *Camellia sinensis* (P0605). There were 10 compounds present in the 24 HTP fractions, all of which had known structures, as set forth in Figure 17.

Figure 18 illustrates the melanin production inhibitory activity versus cell toxicity of HTP fractions from the organic extract of the whole plant of *Mallotus repandus* (P0368). The multiple peaks exhibiting melanin production inhibitory activity, indicates that a number of active components exist in the crude extract. The peak located from fraction C10 to D12 is a false peak, resulting from cytotoxicity.

Figure 19 illustrates the results of the dereplication of the active peak identified from the melanin inhibition assay of the HTP fractions of the organic extract derived from *Mallotus repandus* (whole plant) (P0368). Figures 19A-F depict the total ion chromatograms of active fractions D2 to D7 collected from off-line LC/MS. The peak located at a retention time of 16.33 minutes, which showed up in fractions D3-D6, matches exactly the peak of tyrosinase inhibition. Figure 19G depicts the mass spectrum of this peak (Rt=16.33 min.) from fraction D4. Dereplication resulted in the identification of the known polyphenol Pterocaryanin B (Figure 19H).

Figure 20 depicts graphically a profile of the inhibition of COX-1 and COX-2 by the isolated free-B-ring flavonoid, Baicalein, from the roots of *Scutellaria baicalensis* (P0483). The compound was examined for its inhibition of the peroxidase activity of recombinant ovine COX-1 (♦) or ovine COX-2 (□). The data is presented as percent inhibition of assays without inhibitor. The IC₅₀ for COX-1 was 0.18 µg/mL/unit of enzyme while the IC₅₀ for COX-2 was 0.48 µg/mL/unit.

Figure 21 illustrates the inhibition of arachidonic acid induced inflammation by a standardized Free-B-Ring Flavonoid extract isolated from the roots of *Scutellaria baicalensis*. The *in vivo* efficacy was evaluated based on the ability to inhibit swelling induced by direct application of arachidonic acid. The average differences in swelling between the treated ears

WO 03/002134

PCT/US02/20602

17

and control ears are represented in Figure 21A. Figure 21B illustrates the percent inhibition of each group in comparison to the arachidonic acid treated control.

Figure 22 depicts a sale sheet for the dietary supplement Univestin™, which was discovered and developed using the Phytologix™ technology platform of this invention.

Figure 23 illustrates the certificate of analysis (COA) for one representative batch of Univestin™ as a commercial product sold in nutraceutical and cosmetic markets.

Figure 24 depicts the Phytologix™ discovery process schematically. From the analysis of plant collection libraries and market requirements, high throughput screening models were developed to assay the prioritized plant extracts. After identification of the biological activity, the pharmacological and safety profiles were generated based on a standardized extract/enriched fractions/pure compound. The output of this process is a product candidate.

Figure 25 illustrates the Phytologix™ development process schematically. The product candidate, information search and product development leads to the identification of plant sources for production usage, to make recommendations on intellectual property position and market advantage. Manufacturing process development and production of pilot scale prototype product would be followed with confirmation of efficacy and safety profiles. The completion of the Phytologix™ process would be marked with successful clinical trials and final product launch.

Figure 26 illustrates a critical task checklist that may be utilized in the Phytologix™ process to keep track of critical activities and data generation.

Figure 27 demonstrates the time, cost estimation and decision making process in the Phytologix™ platform. It shows the requirement of full time employees, and the time and cost involved for each stage of discovery and development. It gives the project manager an opportunity to evaluate the progress of the project at each critical decision making point.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

18

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Various terms are used herein to refer to aspects of the present invention. To aid in the clarification of the description of the components of this invention, the following definitions are provided.

As used herein a "**sample**" refers to a biological or natural material selected from the group consisting of materials of botanic, microbial, fungal, mineral, marine, animal or human origin. In a preferred embodiment of the invention the sample is a medicinal plant. The terms "**specimen**" and "**biomass**" are used interchangeably with the term sample. In a preferred embodiment the sample is a plant.

"**Nutraceutical**" as used herein refers to a composition of matter targeted to an industry or market that has been defined by the "Dietary Supplement Health and Education Act of 1994 (DSHEA)" and targets humans, as well as, other animals.

"**Cosmetic**" as used herein refers to a composition of matter directed to an industry or market that targets prevention, treatment and maintenance of normal function, appearance and integrity of the skin, hair, figure and other physical appearance of humans, as well as, other animals.

"**Natural product**" refers to an element, compound, secondary metabolite or structural component that exists in natural resources. A natural product could be a single compound or a mixture of multiple compounds.

"**Natural material**" refers to the original material obtained directly from natural resources. It may be either the whole plant or part of a plant, an animal, a marine material, a microbial fermentation batch, a soil sample, a piece of mineral material, etc.

"**Extraction**" refers to a process used to isolate natural products from a natural material with a solvent, supercritical fluid, by a distillation, pressing, or sublimation processes. The output of the extraction process is called an "**extract**." Any known method of extraction can be used with the method of this invention.

"**Fractionation**" refers to a process to separate an extract into multiple parts or fractions that contain a single or a mixture of natural products.

"**Dereplication**" refers to a process to analyze without isolation a natural product, a fraction or an extract for physical, spectroscopic and structural information; to compare the

WO 03/002134

PCT/US02/20602

19

information with internal and commercial databases; and to reach a conclusion on the existence of novel and/or known compounds. Dereplication is used to determine how to direct further investigations.

An "**active agent**" and/or "**biologically active agent**" and/or "**bioactive agent**" refers to a biological function of a natural product. Examples of biological activity include, but are not limited to enzyme inhibition, receptor binding, impact on gene expression, cell function regulation, change of protein production, animal function regulation and animal disease model manipulation, as well as effects on other measurements of biological output.

A "**relational database**" refers to a computerized data management system that stores and retrieves data, processes and presents information and automates repetitive tasks.

A "**macro**" refers to computer software codes, such as "Visual Basic" or "VBA language" that enable the database to perform a designated action for automating a particular task or series of tasks.

A "**query**" refers to a question or inquiry posted to the relational database regarding the information stored in tables within the database. A specifically designed query can choose data from specific tables, sort and filter the data, perform calculations, create tables, forms, graphs and reports.

"**Concentration**" refers to amount of an extract, a fraction, or a natural product in a given volume of solvent. The extract plates are prepared with similar concentrations of extract and the fraction plates with variable concentrations in each cell that reflect the normal distribution of a natural product based on its physical properties and behaviors on a column. The concentration peak, which is revealed in the dereplication process and matched with biological profiles, is critical information for the identification of bioactive components. The concentration of a natural product must be adjusted based on the sensitivity and properties of the bioassay or screening models.

"**Bioassay**" or "**biological screening**" refers to an *in vitro* and/or an *in vivo* biological, biochemical or genomic function model(s) and a testing process that measures the effects of a natural product.

"**High throughput purification**" or "**parallel chromatography**" refers to a method designed to perform one set of multiple column separations, while simultaneously washing

WO 03/002134

PCT/US02/20602

20

and equilibrating another set of columns. The process is performed on an instrument that is controlled by computer software.

A "**pre-packed column**" refers to a column that has been prepared based on a standardized packing protocol with the same type, quantity, particle size of resin and into the same size and diameter of column. It may be packed internally or purchased as a commercial product.

"**Chromatogram**" refers to an illustration of a chromatographic eluent based on the UV/VIS absorption, ionization intensity, nuclear magnetic resonance signals, light scattering capability, reflect index and other physical properties of the components of the eluent that are detected and elicited by passing the eluent through a specific detector.

A "**novel compound**" refers to a natural product with unknown chemical structure and composition; and/or known chemical structure, having a new biological activity/function.

A "**known compound**" refers to a natural product that has a published chemical composition/structure with recognized biological activities/functions.

"**Commercial database**" refers to a service and/or an information management system that can be accessed by paying a subscribed fee. Such databases include, but are not limited to NERAC, DIALOG, the Dictionary of Natural Products, Chemical Abstracts Service's Registration File, NAPROLERT, MEDLINE, DEREK, and the Bioactive Natural Product Database.

"**Therapeutic**" as used herein, includes treatment and/or prophylaxis. When used, therapeutic refers to humans, as well as other animals.

"**Pharmaceutical or therapeutic profile**" refers to the capability of modulating the activity and function of biological system, biochemical materials and gene targets without significant toxicity in the effective dose range.

"**Pharmaceutically or therapeutically effective dose or amount**" refers to a dosage level sufficient to induce a desired biological result. That result may be the delivery of a pharmaceutical agent, alleviation of the signs, symptoms or causes of a disease or any other desirous alteration of a biological system.

A "**host**" is a living subject, human or animal, into which the compositions described herein are administered.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

21

"**Safety profile**" refers to the level to which an active nutraceutical and/or cosmetic agent allows maintenance of the normal activity and function of the biological system, biochemical materials, and molecular biology targets after it has been administered in a considerable amount.

A "**standardized extract**" refers to an extract generated from a production process that contains a specific component profile or fingerprint compounds with defined quantities of individual and/or total active natural products.

A "**product candidate**" refers to a standardized extract/fraction/natural product that possesses a desired biological activity and safety profile and is suitable as a commercial ingredient for the nutraceutical and/or cosmetic industries.

A "**prototype product**" refers to a trial product that is produced on manufacturing scale based on a specification of chemical profile and concentration of active agent from a designated biomass.

"**Clinical evaluation**" refers to studies of the effectiveness, safety, side effects, and contraindications on humans of a natural product based on a specifically designed and pre-approved clinical trial protocol.

Note, that throughout this application various citations are provided. Each citation is specifically incorporated herein in its entirety by reference.

The PhytoLogix™ discovery process can most generally be described as a comprehensive method for discovering and developing novel therapeutic pharmaceutical, nutraceutical and cosmetic agents comprising the steps of: (a) identifying and collecting a pre-identified biological sample; (b) extracting the biological sample using a two solvent system extraction procedure; (c) separating the extracts using two separate high throughput (HTP) fractionating methods and simultaneously determining the activity of each HTP fraction; (d) dereplicating the active fractions to identify the compounds present; and (e) generating an indication, pharmacological and safety profile for each novel compound from step (d). The pre-selection of sample to be collected is based upon traditional use.

To ensure that the PhytoLogix™ discovery program was successful, it was essential to collect medicinal plants and other biosamples from around the world. Therefore, following the United Nations' Treaty of Convention on Biological Diversity, the Phytologix™ program has established eight international ethno-botanical collection agreements that cover the

WO 03/002134

PCT/US02/20602

22

continents of Asia, South America, North America, Africa and other geological regions. In contrast to randomized plant collection programs, Phytologix™ focuses on documented medicinal plants and other documented biomaterials. Due to thousands of years of historic use, these medicinal plants and other biomaterials have already been pre-selected and clinically tested for human consumption. Thus, they are most likely to yield safe and efficacious pharmaceutical, nutraceutical and cosmetic products in contrast to a randomized collection of biomaterials. Available information regarding historic use, in combination with available information provided by modern research on medicinal plants and other biomaterials provides considerable evidence regarding potential clinical indications, as well as, probable mechanisms of action. This information also assists in establishing screening models based on available ethnomedicinal information. The pre-selection based upon traditional use of plants and other natural biomaterials for Phytologix™ discovery is unique to this invention and critical to ensure a high positive hit rate, a safe product and a short discovery cycle. In a preferred embodiment, the sample is a medicinal plant.

All sample collections were performed using the standardized collection and voucher specimen preparation procedures as illustrated in Example 1. In a preferred embodiment between 1 g and 10,000 g of sample are collected. A standardized plant/sample collection form was filled out for each sample collected and the information was transferred to a searchable informatics database as illustrated in Example 2 and Figure 2. In one embodiment, this invention discloses a unique biomass registration system, which entails giving an exclusive code to each sample collected. The designated code is directly related to the natural origin of biomass as illustrated in Example 1, and can be used as a primary key to link all the information together in the informatic database.

Another embodiment of this invention includes the preparation of two specimen vouchers for each sample collected. A taxonomy form is attached to each voucher specimen for purposes of identification. The taxonomy form contains information regarding the identification of the sample, collection of the sample and collector name, etc. Such efforts are critical and unique to guarantee the integrity and authenticity of the biomass during the research stage of the process and ensure the potential of successful recollection and production during the production stage of the invention. As set forth in Example 1, to date the Phytologix™ collection process has resulted in the acquisition of 1,170 medicinal plants

WO 03/002134

PCT/US02/20602

23

and other natural materials. Two sets of voucher specimens have been prepared for each sample acquired as described in Example 1. Additionally, 500 to 2,000 grams of dry materials per biomass have been stored. This collection of specimens includes 266 families, 805 genera and 932 different species collected from around the world.

The present invention includes a BioInformatics driven assessment of a novel medicinal plant library. With a current collection of more than one thousand and potential access to more than 10,000 medicinal plants and other biological specimens throughout the world, the PhytoLogix™ discovery program includes a relational database containing information including, but not limited to ethno-indication and phytochemistry. This database enables the prioritizing for screening of medicinal plants having the most potential based upon traditional use. An example of this is demonstrated in Table 1, using for purposes of illustration the goal of the discovery and development of a novel nutraceutical product for arthritis pain. To do this, one would perform a search of the informatic database using "Arthritis" as a key word. The search results in the listing of 18 plants that have been used traditionally for the treatment of arthritic pain. (Table 1) The discovery process can therefore be focused on the evaluation of those eighteen plants, as opposed to a randomized screening of any plants. This strategy offers a significant advantage over randomized screening in that screening methods traditionally use animal models and thus, only a limited number of samples can be screened. However, randomized screening is not excluded according to the method of this invention. The method of this invention can also be extended to high throughput screening methodology, based on mechanism of action, as well as, traditional use. This invention also includes the alternative of random screening by offering standardized extracts and HTP fractions in 96-deep-well plates.

The PhytoLogix™ Discovery Process relies upon multiple standardized extraction and fractionation protocols, which allow the generation of diversified extracts and fractionation libraries in a high throughput format at a limited cost. Every biomass collected in the PhytoLogix™ program was processed following a standardized extraction protocol, as described in Example 3. This method of extraction offers several advantages when compared to the extraction methodology described to date. First and foremost, the dual extraction strategy described herein, provides a significantly more complete and extensive natural

WO 03/002134

PCT/US02/20602

24

product profile from each biomass. Not a single important type of natural product will be missed using this process.

As described in Example 3, the sample, preferably from 1 g to 1000 g, is first extracted with a medium polarity solvent combination, such as methylene chloride:methanol in a ratio of 1:1. The combination of a low polarity solvent, such as methylene chloride with a solvent of high polarity, such as methanol will yield a solvent system that can dissolve not only low to medium polarity compounds, such as terpenoids, alkaloids, fatty acids, flavonoids, steroids, lignans, benzophenones, chromones, and anthraquinones, but also can dissolve high polarity compounds, such as terpenoids, alkaloids, fatty acids, flavonoids, steroids, lignans, benzophenones, chromones, and anthraquinones etc., which contain multiple polar functional groups and/or mono-, di- and tri-glycosides. The low polarity solvents can be selected from any known low polarity solvents used in the art to perform extractions. In a preferred embodiment the low polarity solvent is selected from the group consisting of an alkane having 6-10 carbons, a halogenated alkane having 1-4 carbon atoms, wherein each carbon atom has 1-4 halogen atoms, an ester having the formula, R'COOR", wherein R' is selected from an alkyl group having between 1-6 carbons and R" is selected from an alkyl group having between 1-8 carbons and a ketone having between 3-12 carbons. Examples of low polarity solvents include, but are not limited to, methylene chloride, ethyl acetate and chloroform. The polar solvent can also be selected from any known polar solvents used in the art to perform extractions. In a preferred embodiment the polar solvent is selected from the group including, but not limited to, DMSO, THF and an alcohol having one to eight carbons. Examples of alcohols include, but are not limited to methanol, ethanol, propanols and butanols. Water soluble, higher polarity components, such as quaternary and ionized alkaloids, oligosaccharides, polysaccharides, salts of organic acids, phenolic salts, anthocyanidins, amino acids, peptides, tannins, minerals and other inorganic compounds, will only be extracted by water, acidic water, basic water, or aqueous buffer. Therefore, following extraction with the dual organic solvent system, the biomass is extracted with water, acidic water, basic water, or aqueous buffer to dissolve the water-soluble components contained in the biomass. In a preferred embodiment, the quantity of solvents used in both extractions is one to ten times the ratio of the weight of the extracted sample. The extraction may be carried out using any known methods for extraction including, but not limited to

WO 03/002134

PCT/US02/20602

25

shaking, sonication, refluxing, stirring, and pressurized mixing, and filtering. Representative organic and aqueous extracts performed on various plant species are set forth in Table 2.

The efficiency of the extraction methodology described herein is illustrated in Example 4. Further extraction of the biomass with methanol after the organic and aqueous extractions described in Example 3, provided only a small amount of extractible material (Table 3), having exactly the same HPLC chromatograms (Figures 5 and 6). The HPLC chromatograms depicted in Figures 5 and 6 were generated using two different detection methods – Photo Diode Array (Figure 5) and ion trap mass spectrometer (Figure 6). As can be seen in Figures 5 and 6, using either method of detection there were no specific peaks present in the methanol extract, that were not also present in either the organic extract or the aqueous extract.

Another advantage of the extraction methodology described herein is that the extraction process yields enough material for further fractionation and bioassays. For example, extraction of 60 grams of biomass, generates approximately 1-8 grams of organic extract and 1-6 grams of aqueous extract. These quantities provide enough material for a number of screens and HTP fractionations.

In one embodiment of this invention, a novel method to prepare an extract library for high throughput assays is described. This method comprises the generation of a set of extract master plates, by dissolving the organic and aqueous extracts in DMSO and deionized (DI) water, respectively, at a concentration of between 0.01 mg to 1000 mg/mL of solvent. In a preferred embodiment the concentration of the extract is 50 mg/mL of solvent. The sample master plate is selected from the group including, but not limited to, a 96, 192, 384, 576, 768, 960, 1152, 1344 or 1536 well plate. In a preferred embodiment the solutions were stored in a 96-deep-well plate with 88 samples per plate. The extracts can then be aliquoted and screened with high throughput models. There is enough material in each cell to complete 50-100 typical high throughput screens. Other solvents that can be used to dissolve the organic and aqueous extracts include, but are not limited to DMSO, DMF, THF, ketones having three to ten carbons and alcohols having one to five carbons.

A significant discovery disclosed herein is a novel method for the chromatography or high throughput fractionation of the extracts, which is both efficient and economically sound. This method is described in Examples 5 and 6. The method for the high throughput fraction

WO 03/002134

PCT/US02/20602

26

of extract is comprised of the steps of: (a) using a parallel chromatography system or a high throughput purification (HTP) system; (b) separating the organic extract with a normal phase pre-packed column; (c) separating the aqueous extract with a reverse phase pre-packed column; (d) detecting the eluent with detector(s); (e) collecting fractions; and (f) evaporating the solvent. In a preferred embodiment the chromatography system is comprised of two to four solvent delivery pumps, solvent mixers, and appropriate auto line switchers. The chromatography is carried out at ambient, low, medium or high solvent pressure and at ambient temperature or a temperature from 20 to 80°C. The normal phase column is packed with a resin selected from the group including, but not limited to silica gel, alumina, and amino propyl, cyano propyl, diol florisisil or polyamide, ion exchange group-bond resins. The reverse phase column is packed with a resin selected from the group including, but not limited to a C-2, C-4, C-8, C-18, LH-20, XAD-4, XAD-16 or polystyrene-divinyl benzene based resin. The particle size of the resins is from 10 to 200 μm . The chromatography column is packed with 1 to 500 grams of resin.

Many different methods have been reported for the fractionation of plant extracts. Some of those methods even utilize solid phases similar to those described herein, such as silica gel and reverse phase C-18 columns. However, as set forth in the Background of the Invention, most of the prior art methods use step gradients to provide a limited number of fractions (usually less than 20 fractions) and incomplete separations that require further chromatographic purification. The present invention is superior to prior art methods, in that the separation on the normal phase column is carried out using a gradient of a unique combination of three organic solvents that include an alkane having from six to ten carbons, an ester R^1COOR^2 , wherein R^1 is selected from an alkyl group having between one to five carbon and R^2 is selected from an alkyl group having between one to six carbons, and an alcohol (R^3OH) wherein R^3 is an alkyl group having between one to six carbons. This three-solvent system combination significantly improves separation and the quality of fraction in each well, as illustrated in Figures 7 and 8. As demonstrated by this invention, from the organic (Example 5) and/or aqueous extracts (Example 6), a natural product can be purified using a single column. Furthermore the product is distributed in limited number of cells/fractions (usually in 2-8 cells). The separation on the reverse phase column is carried out with a combination of two solvents: DI water and a solvent selected from the group

WO 03/002134

PCT/US02/20602

27

consisting of an alcohol with one to four carbons, acetonitrile, THF, or a ketone having three to twelve carbons.

Although, some known methods use HPLC systems with gradient capacity and better separation capability, the quantity of the materials that can be loaded on the columns and the throughput of the fractionation are incomparable with the current invention. As illustrated in Examples 5 and 6, the organic and aqueous extracts can be loaded onto commercially available pre-packed columns, typically, a silica gel column for organic extraction and a C-18 column for aqueous extraction, at a level of 100 mg to 2000 mg. At such levels, each fraction resulting from the high throughput purification will contain milligrams of materials that can be dissolved into a solution at concentrations of 1-10 mg/mL. Thus, this invention has solved two of the major problems in natural product research, one of which is how to prevent false negative results, in which the minor active, but rather novel compounds fall under the bioassay detection limits or positive threshold. The other problem solved is how to eliminate false positives due to synergistic effects from a mixture of multiple compounds with lower than desirable biological potency. The method disclosed herein not only separates individual components present in the crude extracts, but also significantly enriches minor active components in the plant extracts, which leads to a much greater chance that these minor components will be detected in the screening process.

The detector may be any detector used in the art for such purposes including, but not limited to an ultraviolet (UV)/visual light detector, a Mass Spectrometer (MS) detector, a Nuclear Magnetic Resonance (NMR) detector, a refractive index (RI) detector or a light scattering detector (LSD). The ultraviolet (UV)/visual light detector may be comprised of single or dual channels with single, continuing or broadband wavelength from 100 - 1000 nm. The MS detector may be comprised of an electronic spray ionization, sonic spray ionization or chemical ionization chamber; ion trap or single or triple quadrupole mass detection with positive or negative mode. The NMR detector may be comprised of a proton or carbon probe.

Another unique characteristic of this invention is the online structure information collection. This invention utilizes a high-pressure chromatography system in a parallel processing mode, i.e., multiple simultaneous column runs coupled to a robot controlled liquid handling system that is triggered to deliver chromatographic eluent (containing individual chemical compounds) based upon a pre-programmed time or volume quantity, or on the basis

WO 03/002134

PCT/US02/20602

28

of a chemical response pattern, preferably an ultraviolet light absorption spectrum or ionization pattern. This pattern, when compared to a library of patterns by computer analysis will determine whether the compound is a known or unknown chemical entity. Figures 14 to 16 depict the online mass spectroscopic data of one HTP fraction and the offline analysis of the same fraction. This method is much more efficient, because the spectroscopic data is collected at the time of separation, rather than analyzing collected fractions in a separate process. Additionally, the method has been shown to be just as accurate. In the example illustrated in Figures 14-16, the HTP system directed the sample simultaneously to both the liquid handling system where an aliquot of the eluent was dispensed in microtiter plates and to an ion trap mass spectrometer with a super sonic ionization chamber where the molecular ion and fragmentation pattern of the compound were determined. From the mass spectrum, it is possible to derive the molecular weight and general structural information regarding the components of the fractions. This information is compared to a chemical library by computer analysis to confirm purity and tentative identification.

As demonstrated in Examples 5 and 6, the method disclosed herein is proven to be highly efficient. The throughput of the fractionation process can generate 1232 fractions daily from 14 organic extracts or 2618 fractions from 32 aqueous extracts. This throughput is ten times higher than any of the known methods described as set forth in the Background of the Invention.

Finally, a significant advantage of the methodology disclosed herein is the low cost of operation. The detailed analyses of the cost of consumables are set forth in Tables 4 and 5. The material costs to generate one fraction of a sample from the organic or aqueous extracts are only sixteen cents and thirty-two cents, respectively. The normal phase columns can only be used one time, however, the reverse phase columns can be reused up to sixty times with appropriate washing between each run. The performance of the C-18 column has been closely monitored with a known compound mixture of aloe chromones (data not shown). The separation was shown to be highly reproducible as demonstrated in Figure 9, by performing twelve C-18 column fractionations on same aqueous extract. There is no comparable method in the prior art, which can generate such a high quality natural product fraction library at such a low cost and high throughput.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

29

Once the biological and/or indication targets are defined, the PhytoLogix™ approach to implementing a high throughput screen (HTS) is accomplished by applying biochemical (enzymatic, receptor binding assays), gene expression, functional or biological models as the primary means of screening extracts to identify compounds in the extract having a particular activity. In a preferred embodiment the model used includes, but is not limited to, enzyme inhibition, receptor binding, gene expression, cell function regulation, protein production, animal physiological, neurological, and behavior function regulation and animal disease model manipulation and other measurements of biological function which are known to those in the art. The data regarding the activity of the fractions can be collected from the extracts, fractions of the extracts, purified compounds, semi-synthetic and synthetic compounds.

To demonstrate the value of an extract library generated using the method of the present invention, Example 7 describes an enzymatic screening and the results obtained. In order to identify anti-inflammatory compounds whose mechanism of action is the inhibition of the cyclooxygenase (COX) enzymes, a COX enzyme inhibition assay was developed to evaluate an extract library comprised of 1230 extracts from 615 medicinal plants collected from China, India, and other countries. The general method used for preparing these extracts is described in Example 3. The extraction process yielded an organic and an aqueous extract for each species examined. These primary extracts were the source material used in the preliminary assay to identify inhibitors of the enzyme's peroxidase activity, which is one of the main functional activities of cyclooxygenase and is responsible for inflammation by the conversion of PGG₂ to PGH₂ and ultimately PGE₂. This assay is described in Example 7 and the results are summarized in Figure 10. With reference to Figure 10, after screening 1230 plant extracts, a total of 15 organic extracts (1.2%) and 7 aqueous extracts (0.6%) were confirmed as having greater than 60% inhibition with a dose response confirmed by separate experimentation as described below. The representative activity measurements on individual plant extracts are set forth in Table 6. With reference to Table 6, it can be seen that two species of *Scutellaria* and three other plant species, all of which contain Free-B-ring flavonoids as common components, showed inhibitory activity in the primary screen against the peroxidase activity of COX-2 albeit to differing degrees. The COX-2 inhibitory activity is found predominantly in the organic extracts, which contain most of the medium polarity Free-B-Ring flavonoids. The COX-2 inhibitory activity from the primary assay of the crude

WO 03/002134

PCT/US02/20602

30

extracts was confirmed by measurement of dose response and IC_{50} (the concentration required to inhibit 50% of the enzyme's activity). The IC_{50} values are set forth in Table 7. As can be seen in Table 7, in this assay *Scutellaria orthocalyx* root extract and *Murica nana* leaf extract were the most efficacious (IC_{50} = 6-10 μ g/mL). Extracts from *Scutellaria sp.* that demonstrated the greatest selectivity against COX-2 relative to COX-1 were those generated from *Scutellaria lateriflora* (COX-2 IC_{50} : 30 μ g/mL; COX-1 IC_{50} : 80 μ g/mL). Thus, the primary screen for inhibitors of the COX enzyme resulted in the identification of twenty-two extracts that were efficacious *in vitro* and some of which demonstrated specificity for the COX-2 enzyme relative to COX-1.

Example 8 illustrates the screening of a plant extract library for inhibitors of the enzyme tyrosinase in an attempt to identify a novel skin whitener for cosmetic use. From this assay, 43 organic extracts were identified as having tyrosinase inhibitory activity, equivalent to a hit rate of 5.6% hit rate. This was significantly higher than the 0.78% hit rate for the aqueous extracts, based on the screening of 774 plant extracts. The results are set forth in Figure 11. Since the targeted indication is a cosmetic product for use as a skin whitener, the compounds with lower polarity should have better skin penetration. The screening results demonstrated the quality of the extract library that automatically eliminated the natural products with unwanted physical properties due to the selectivity of both the extraction and bioassay processes.

Direct screening of the fractionation library has its own value, since each fraction will contain one major compound in high enough concentration that the likelihood of obtaining false positives and false negatives, which is commonly a problem with crude extracts, will be eliminated. Additionally, minor bioactive components are more likely to be detected, because the concentration of these components is enriched enough to render them detectable. Example 9 describes the screening of the bioactive extracts isolated as described in Example 7. In this example each of the HTP fractions was examined for its ability to inhibit the peroxidase activity of both COX-1 and COX-2. A representative HTP/UV chromatogram of the fractions derived from the aqueous extract of *Camellia sinensis* is illustrated in Figure 12. After screening all of the 88 fractions from the 96-well plate, a total of 8 HTP fractions exhibited greater than 60% COX inhibition as illustrated in Figure 13. Following the dereplication process described in Example 11, ten individual compounds were identified in

WO 03/002134

PCT/US02/20602

31

those fractions and surrounding fractions that contributed to the COX activity. There are many components in the crude aqueous extract that could interfere with the assay or cover up the potency. However, in this invention, these components have been separated out into other wells. This process greatly enhances the positive hit rate from a single data point in the crude extract to eight positive fractions from which multiple bioactive compounds have been identified.

One of the major advantages of the HTP fraction library created using the method disclosed herein is the significantly improved efficiency and accuracy of the dereplication. Dereplication is a method used to identify to the greatest extent possible, the structure and physical property profile of an active sample in order to determine the likelihood of the existence of novel compounds in the sample. The determination that there may be novel compounds justifies further isolation and identification efforts. To achieve this goal, an internal structure and spectroscopic characteristics database was developed with more than 250 known pure compounds that possess representative structural skeletons of common natural products. Example 10 describes the method used to construct this database. As illustrated in Example 10, the HPLC method used for the analysis of these compounds was an improvement over known methods. The method is much shorter (total of 8.5 minutes per analysis) without sacrificing separation capacity, as a result of using a smaller particle size C-18 resin, a smaller diameter, but a longer column. This internal database currently contains six fields for each individual compound including, type of compound, name of compound, molecular weight, chemical structure, UV spectrum and retention time. Table 8 sets forth representative information in the database for flavonoids, alkaloids, caffeic acids, terpenoids, chromones, anthraquinones, iridoids, acetophenones, and coumarins. Using the standardized HPLC method described above, an active sample will be separated with a reverse and/or normal phase column with a gradient solvent system. The detected peak from PDA and MS will be analyzed as follows: the UV spectrum of the peak is searched against the internal spectrum database and external database for structural skeleton or the type of compound, i.e., flavan, isoflavonoid, terpenoid, caffeic acid derivative etc.; the molecular ion of the peak is then used for initiating a molecular weight search using a database, such as the Dictionary of Natural Products, with other searchable fields, such as, plant Latin name, type of compound,

WO 03/002134

PCT/US02/20602

32

UV spectrum; and finally the retention time is used to get a general idea about the polarity, log P, solubility, and other physical properties of the compound.

The uniqueness of the Phytologix™ dereplication process is illustrated in Examples 10 and 11. Example 11 describes the dereplication of the HTP fraction library derived from the aqueous extract of green tea for inhibitors of COX peroxidase. A total of 24 fractions surrounding the COX inhibition peaks as shown in Figure 13 were analyzed using standardized HPLC. After obtaining and evaluating retention times, UV and MS data, all of the major components in each of the 24 cells have been dereplicated and identified as known catechin and flavonoid types of compounds. The results are set forth in Figure 17. Each compound was distributed among 3-4 individual cells. Since the COX inhibitory activity of catechins and flavonoids are well known, the conclusion from the dereplication process is that these active fractions are not worth pursuing.

Example 12 describes the results of the dereplication of an HTP fraction library for inhibition of melanin formation in a B16 cell line. Briefly, following the inhibition and cell viability assay, the active organic extract from the whole plant of *Mallotus repandus* was fractionated with HTP as described in Example 5. All of the HTP fractions were tested for tyrosinase inhibitory activity and the results are set forth in Figure 18. With reference to Figure 18, there are three major peaks exhibiting > 50% inhibition of melanin synthesis and seven other peaks exhibiting weaker inhibition. The sharp activity peaks are indicative of the quality of the separations, which distributed the active components in three to five cells.

Since the melanin formation assay was run against a cell viability assay, the activity peak maximum at fraction D11 is most likely due to cytotoxicity. The dereplication of another active peak located from fractions D2 to D7 is illustrated in Figure 19. Every active fraction was analyzed by HPLC. There was a peak located at Rt=16.33 minutes in the HPLC chromatogram of each fraction. This peak showed the same increasing to decreasing intensity as the trend exhibited by the melanin inhibition activities of those fractions. Further analysis of the UV spectrum revealed that this compound was a gallic acid derivative. Search of the Dictionary of Natural Products for molecular ion and plant genus name lead to the identification of a known compound – Pterocaryanin B, whose structure is depicted in Figure 19H. The poly-hydroxyl groups in the structure are what are responsible for the inhibition of melanin synthesis. Because this was a known compound no further isolation was necessary.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

33

In conclusion, the accelerated active identification process, referred to as dereplication, which includes an internal Structure and Spectroscopic database, in conjunction with use of the Dictionary of Natural Products and other external databases accessible through NERAC service, provides highly efficient and rapid structural identification that enables elimination of known components, false positives and false negatives and leads to the discovery of the novel active natural products by performance of assay directed isolations. The methodology described herein offers significant advantages over known methods, particularly the development and use of the purified compound library. First, with the unique separation conditions and a single chromatography approach, the Phytologix™ HTP fraction library is much easier and cheaper to generate than other known libraries as described in the Background of the Invention. As demonstrated, the Phytologix™ HTP library contains high purity natural products in individual cells in a sufficient quantity to execute a number of high throughput assays. Second, the dereplication process according to the Phytologix™ platform is closely related to the bioassay results. Thus, only the active fractions and limited surrounding fractions are analyzed, which both saves time and focuses the effort, as opposed to dereplication of all fractions and/or randomized dereplication of some fractions as described in the prior art. Third, Phytologix™ dereplication utilizes the natural weight distribution curve of the active fractions, obtained from the UV or MS chromatograms by matching with biological activity profiles, enables identification of the active components much more accurately and quickly. Finally, it has been demonstrated that the shorter offline HPLC method and online data collection from the Phytologix™ process can achieve the same results and conclusions in a much more cost effective and time efficient manner.

If it is determined from the dereplication process that the active HTP fractions contain a novel compound or compounds, an extensive isolation, purification and identification process will be initialized, as illustrated in Example 13. This example illustrates the isolation, purification and identification of the compound Baicalein, which inhibits the activity of the COX enzyme. Once purified the anti-inflammatory activity of the pure compound was confirmed. The results are set forth in Figure 20.

Once active botanical extracts and/or fractions and/or compounds are identified as having a novel mechanism of action and/or specific therapeutic value, chemical composition profiling and active component standardization are completed. Evaluation and confirmation

WO 03/002134

PCT/US02/20602

34

of the safety and therapeutic efficacy of the compound is achieved through secondary screens with protein, cell, gene and animal models. Example 14 describes the confirmation of the anti-inflammatory activity of a standardized plant extract that was identified and developed using the Phytologix™ platform. The results are set forth in Figure 21. The validation process was designed to establish both *in vitro* and *in vivo* efficacy, information on safety and toxicity, bio-availability and dosage. Taken collectively, the Phytologix™ Discovery Process establishes market identification and differentiation of the novel ingredients with a competitive advantage.

The final step of the Phytologix™ Discovery Process is a product development strategy directed by a bioinformatic database for intellectual property positioning, raw material sourcing and pilot scale process optimization. Pharmaceutical activity and safety/toxicology profiling are reconfirmed for the product after production to prepare for regulatory approval and to provide regulatory guidance and effective claim substantiation for customers.

Example 15 summarizes the whole process utilizing a real life example in developing a natural COX inhibitor as a nutraceutical product. The output is a novel composition of matter referred to as Uninvestin™, which targets joint pain and inflammation. This composition of matter is described in U.S. Patent Application Serial No. 10/104,477, filed March 22, 2002, entitled "Isolation of a Dual Cox-2 and 5-Lipoxygenase Inhibitor from Acacia.", which is incorporated herein by reference in its entirety. This product is now commercially available and Figures 22 and 23 set forth the selling sheet and the certificate of analysis for this product.

A general summary of the Phytologix™ process is provided in Example 16 and illustrated in Figures 24-27. Figure 24 depicts the Phytologix™ discovery process schematically. From the analysis of plant collection libraries and market requirements, high throughput screening models were developed to assay the prioritized plant extracts. After identification of the biological activity, the pharmacological and safety profiles were generated based on a standardized extract/enriched fractions/pure compound. The output of this process is a product candidate. Figure 25 illustrates the Phytologix™ development process schematically. With reference to Figure 25, the product candidate, information search and product development leads to the identification of plant sources for production usage, to

WO 03/002134

PCT/US02/20602

35

make recommendations on intellectual property position and market advantage. Manufacturing process development and production of pilot scale prototype product would be followed with confirmation of efficacy and safety profiles. The completion of the Phytologix™ process would be marked with successful clinical trials and final product launch. Figure 26 illustrates a critical task checklist that may be utilized in the Phytologix™ process to keep track of the critical activities and data generations. Figure 27 demonstrates the time, cost estimation and decision making process in the Phytologix™ process. It shows the requirement of full time employees, and the time and cost involved for each stage of discovery and development. This gives the project manager an opportunity to evaluate the progress of the project at each critical decision making point.

The following examples are provided for illustrative purposes only and are not intended to limit the scope of the invention.

EXAMPLES

Example 1. Collection of Plants and Voucher Specimens

The plant to be collected was first identified and the fresh plant was then collected either from the field or from a plant farm. If applicable, the plant parts were cut from the whole plant. Enough material was collected to provide: 10-12 kg of fresh leaves, 7-8 kg of fresh fruits or seeds or whole plant or 5-6 kg of fresh stems or roots. The whole plant or plant parts (referred to hereinafter as plant/plant parts) were cleaned with water and insects, dirt and other contaminants were removed. The plant/plant parts were then dried in open air or using a mechanical dryer at a temperature lower than 60°C. The total weight of the plant/plant parts was recorded both before and after drying. Additionally, a record was kept of any changes in the plant sample that occurred as a result of the drying process. Prior to packing, the plant/plant parts were evaluated for various conditions such as, dryness, insect and fungi infection and cleanliness, etc. The plant/plant parts were then placed into a clean bag labeled with voucher number, plant name, plant parts and weight. If possible each plant sample was packed into one bag. However, if the plant sample was packed into several bags, the number of bags should also be provided on the sample label. A plant collection form (Figure 1) was then filled out and included with the packaged plant. Several individual bags of plants were placed into a cardboard box. A packing list, including the packing date, name of the plants,

WO 03/002134

PCT/US02/20602

36

voucher number, number of bags for each plant and weight of each plant was generated for each box. A desiccant bag was placed into the box and the box was sealed. A copy of collection form (Figure 1) and packing list was sent by mail to prevent loss or damage in the process of shipping and handling.

To prepare voucher specimens, mature whole plant, including flowers and fruits were collected. The fresh plant was pressed flat and placed within newspaper or some other kind of raw paper. The paper was changed everyday until the plant was totally dry. The flowers and seeds of the plant were placed separately into small bags. If the fertile plant was not available, information about the flowers and/or fruits of the plant was obtained from the collector. An attempt was made, however, to collect the voucher specimen when the plant was flowering and fruiting. An individual voucher number was assigned to each plant. The plant voucher number, Latin name, local name, collection place, date and collector name was recorded on a label and the label was placed within the plant voucher. Two sets of vouchers were prepared, one to send to the research facility with the plant for identification purposes and one to place on file with the collector for future comparison.

Upon receipt of the plant materials by the research facility, the voucher specimen was removed and attached to the collection records or any other pertinent documents. The condition of the plant samples was checked and a plant log form was filled out for each sample. An individual number was assigned to each sample, using Pxxxx for plants, Mxxxx for marine materials, Bxxxx for bacteria and microbial, Fxxxx for fungi, Sxxxx for soils, Axxxx for animals, Ixxxx for insects, and Mxxxx for minerals, Vxxxx for vitamins, Oxxxx for organic synthetic compounds and Gxxxx for genomic modulated secondary metabolisms. This number was attached to the voucher specimen.

If the plant sample was not totally dry, it was chopped or ground into smaller pieces and freeze dried as soon as possible. A specimen (10 g, Specimen #1), was retained from each plant sample before grinding. The specimen was placed into a labeled bottle (125 mL) and stored at

-20°C prior to use. Specimen #1 was used for plant macroscopic and microscopic identification purposes only. After grinding, a specimen (100 g, Specimen # 2) of the dry powder was retained and placed into a labeled bottle (250 mL) and stored at -20°C prior to use. Specimen #2 was used for plant chemical identification and comparison. The voucher

WO 03/002134

PCT/US02/20602

37

specimen, together with a copy of the collection records and a plant sample (10 g) was sent to a botanical institute for plant identification. The results of this identification were recorded on a Plant Information Form. The condition of the plant was again checked to assure that it was dry and free from infestation. The ground plant sample was then placed into a wide mouth polypropylene bottle. The material was weighed and the weight was recorded on the label. The Plant Log Form, Plant Tracking Record and Plant Information Form were then submitted to the appropriate personnel. The information from all of these forms was then input into the computer database and all forms were then appropriately filed in a secure location. As of June 2002, the Phytologix™ library contained a total of 1170 plant and other natural materials from more than 300 different families, 900 genera and more than 1100 different species. These plants were collected from China, India, Ghana, USA, and other countries in Asia, South America, North America, and Africa.

Example 2. Generation of Database

A customized Access database was developed to handle all of the information collected concerning medicinal plants and other natural materials. The database is comprised of multiple tables with specific designed relationships among those tables. As illustrated in the Figure 2, typical tables include information such as: Log, Plant Ethno Indication, Ext., Fractionations, Ext. Tracking, Storage, Compound Type, Compound Registration, Sender, Activity, Assay, etc. Information about each sample collected, such as ID #, voucher ID, Genus, Species, Family, plant part, plant status, plant fresh weight, dry weight, geological distribution, Botanical identification, plant collection forms, extract information, ethno indication, assay results, etc. was saved in its respective table. Once entered into its respective table, the information was analyzed and searched using specifically designed macros (Figure 3) and queries. The information was summarized in the form of reports as illustrated in Figure 4. Table 1 sets forth the search results of medicinal plants traditionally used to treat Rheumatoid arthritis and arthritis. Such information will help to prioritize the research efforts by focusing on a limited number of plants (20-50) for a specific target. This "informatics database," which is directed to the discovery process will significantly decrease the product discovery and development risks, costs and times and enhance the possibility of finding truly novel and efficacious products.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

38

Example 3. Preparation of a Plant Extract Library

Plant material was ground to a particle size of no larger than 2 mm. Dried ground plant material (60 g) was then transferred to an Erlenmeyer flask and methanol:dichloromethane (1:1) (600 mL) was added. The mixture was shaken for one hour, filtered and the biomass was extracted again with fresh methanol:dichloromethane (1:1) (600 mL). The organic extracts were combined and evaporated under vacuum at 40°C to provide the organic extract (see Table 2 below). After organic extraction, the biomass was air dried and extracted once with ultra pure water (600 mL). The aqueous solution was filtered and freeze-dried to provide the aqueous extract (see Table 2 below). A sample (100-200 mg) was retained from each extract (aqueous and organic) and stored at -20°C for future reference.

Preparation of extract master plate for bioassays. A sample of each extract in the range of 70 ± 25 mg was placed into a vial, DMSO (1.5 mL) or ultra pure water (1.5 mL) was added to each vial, and the mixture was sonicated until the solid was totally dissolved. The solution was then transferred from each vial into a well in a 96-deep well block. The position and corresponding sample code was documented. The 96-deep-well block was stored in a freezer at -70°C prior to use. To perform the bioassays the sample was allowed to thaw and 50-200 mL of sample was used for each bioassay.

Example 4. Validation of the extraction methodology

Plant material was ground to a particle size of no larger than 2 mm. Dried ground plant material (60 g) was then transferred to an Erlenmeyer flask and methanol:dichloromethane (1:1) (600 mL) was added. The mixture was shaken for one hour, filtered and the biomass was extracted again with methanol:dichloromethane (1:1) (600 mL). The organic extracts were combined and evaporated under vacuum to provide the organic extract (see Table 3 below). After organic extraction, the biomass was air dried and extracted once with ultra pure water (600 mL). The aqueous solution was filtered and freeze-dried to provide the aqueous extract (see Table 3 below). After aqueous extraction, the biomass was dried and extracted twice with methanol (600 mL). The combined methanol solution was evaporated under vacuum and at 40°C to yield the MeOH extract. The organic, aqueous and

WO 03/002134

PCT/US02/20602

39

methanol extracts from same plants were analyzed with HPLC/PDA/MS for comparison of the finger print compounds. The representative results are set forth in Figures 5 and 6.

Example 5. Generation of an HTP Fraction Library from Organic Extracts

Organic extract (400 mg) was dissolved under sonication into a minimum amount of MeOH (around 1-1.5 mL) and manually loaded onto a prepacked flash column. (2 cm ID x 8.2 cm, 10 g silica gel). The column was dried under vacuum until all solvent was evaporated. The column was eluted in parallel using a Hitachi high throughput purification (HTP) system with a unique gradient mobile phase of (A) 50:50 EtOAc:hexane and (B) methanol from 100% A to 100% B in 30 minutes at a flow rate of 5 mL/min. The separation was monitored using a broadband wavelength UV detector and the eluents were collected in 88 fractions in a 96-deep-well plate at 1.9 mL per well using a Gilson fraction collector. The sample plate was dried under low vacuum and centrifugation with SpeedVac Plus from Savant (model # SC250DDA). Figures 7A and 7B illustrate the analysis of the HTP fractions using thin layer chromatography (TLC). This figure demonstrates that HTP yielded impressive separation of different types of compounds based on polarity. The separated components may be distributed in 6-10 cells and in most cases each cell contained either a single compound or at most less than three compounds.

Figure 8 depicts the weight distribution of the sample in each well. There were several peaks that matched each other in the weight distribution profile against the TLC compound spots. DMSO (1.5 mL) was added to each well to dissolve the samples and the 96-deep-well plates were stored at -70°C. The master fraction plates were thawed at room temperature and a portion of each solution (50-200 µL) was taken from each well to make a daughter plate for any designated bioassays. It took approximately 40 minutes to complete two HTP column fractionations and approximately 5 hours to dry eight 96-deep-well plates. Daily throughput for organic extracts is 14 columns and 1232 fractions. Table 4 depicts the cost analysis of the high throughput fractionation of the organic extracts.

Example 6. Generation of an HTP Fraction Library from Aqueous Extracts

Aqueous extract (750 mg) was dissolved in deionized (DI) water (5 mL), filtered through a 1 µm syringe filter and transferred to a 4 mL HPLC vial. The solution was then

WO 03/002134

PCT/US02/20602

40

injected by an autosampler onto a prepacked reverse phase column. (C-18, 15 μm particle size, 2.5 cm ID x 10 cm with precolumn insert). The column was eluted using a Hitachi high throughput purification (HTP) system with a gradient mobile phase of (A) water and (B) methanol from 100% A to 100% B in 20 minutes, followed by 100% methanol for 5 minutes at a flow rate of 10 mL/min. The separation was monitored using a broadband wavelength UV detector and the eluent was collected in 88 fractions in a 96-deep-well plate at 1.9 mL/well using a Gilson fraction collector. The methanol was removed under low vacuum and centrifugation with a SpeedVac Plus from Savant (model # SC250DDA) and the plate was freeze-dried. Ultra pure water (1.5 mL), which was sterile filtered and Endotoxin tested, was added to each well to dissolve the samples and the 96-deep-well plate was stored at -70°C prior to use. The master fraction plates were thawed at room temperature and a portion (50-200 μL) of solution was taken from each well to make a daughter plate for any designated bioassays. Figures 9A-9L illustrate the reproducibility of the HTP separation of an aqueous extract from whole plant of *Ainsliaea henryi*. The aqueous extracts were separated three times on 4 parallel C-18 columns on the HTP and total of twelve 96-deep well plates were generated. The HTP/UV chromatograms from 12 column separations were identical and the samples were combined based on the same well position from the twelve plates.

It takes approximately 20 minutes to complete two HTP column fractionations and approximately 10 hours to dry eight 96-deep-well plates. Daily throughput for aqueous extracts is 32 columns and 2618 fractions. Table 5 depicts the cost analysis of the high throughput fractionation of the aqueous extracts.

Example 7. Screening of the Plant Extract Library for Natural Inhibitors of COX-2 and COX-1

The bioassay directed screening process for the identification of specific COX-2 inhibitors was designed to assay the peroxidase activity of the enzyme as described below. In order to screen for compounds that inhibited the activity of COX-1 and COX-2, a high throughput, *in vitro* assay was developed that utilized the inhibition of the peroxidase activity of both enzymes (Raz and Needleman *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 269:603-607). Briefly, a known concentration of UninvestinTM and/or its individual ingredients --Free-B-ring flavanoids or flavans was titrated against a fixed amount of the COX-1 and COX-2 enzymes,

WO 03/002134

PCT/US02/20602

41

respectively. A cleavable, peroxide chromophore was included in the assay to visualize the peroxidase activity of each enzyme in the presence of arachidonic acid as a cofactor. Typically, assays were performed in a 96-well format. Each inhibitor, taken from a 10 mg/mL stock in 100% DMSO, was tested in triplicate at room temperature using the following range of concentrations: 0, 0.1, 1, 5, 10, 20, 50, 100, and 500 $\mu\text{g/mL}$. To each well, 150 μL of 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 was added, together with 10 μL of 22 μM Hematin diluted with tris buffer, 10 μL of inhibitor diluted with DMSO, and 25 units of either the COX-1 or COX-2 enzyme. The components were mixed for 10 seconds on a rotating platform, after which 20 μL of 2 mM TMPD and 20 μL of 1.1 mM arachidonic acid was added to initiate the reaction. The plate was shaken for 10 seconds and then incubated for 5 minutes before reading the absorbance at 570 nm. Luminescence was read using a Wallac Victor 2 plate reader. The inhibitor concentration vs. % inhibition was plotted and the IC_{50} determined by taking the half-maximal point along the isotherm and intersecting the concentration on the x-axis. The IC_{50} was then normalized to the number of enzyme units in the assay. Figure 10 shows the positive hit rate resulting from the screening of 1230 plant extracts. The inhibition of COX-2 peroxidase by extracts from representative plant species is set forth in Table 6. The data in Table 6 is presented as the percent of peroxidase activity relative to the recombinant ovine COX-2 enzyme and substrate alone. The percent inhibition by the representative organic extracts ranged from 30% to 90%.

Comparison of the relative inhibition of the COX-1 and COX-2 isoforms requires the generation of IC_{50} values for each of these enzymes. The IC_{50} is defined as the concentration at which 50% inhibition of enzyme activity in relation to the control is achieved by a particular inhibitor. In the instant case, IC_{50} values were found to range from 6 to 50 $\mu\text{g/mL}$ and 7 to 80 $\mu\text{g/mL}$ for the COX-2 and COX-1 enzymes, respectively, as set forth in Table 7. Comparison, of the IC_{50} values of COX-2 and COX-1 demonstrates the specificity of the organic extracts from various plants species for each of these enzymes. The organic extract of *Scutellaria lateriflora* for example, shows preferential inhibition of COX-2 over COX-1 with IC_{50} values of 30 and 80 $\mu\text{g/mL}$, respectively. While some extracts demonstrate preferential inhibition of COX-2, others do not. Examination of the HTP fractions and the purified compounds isolated from these fractions is necessary to determine the true specificity of inhibition for these extracts and compounds.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

42

Example 8. Screening of the Plant Extract Library for Natural Inhibitors Tyrosinase

Tyrosinase activity was determined using a modified method of Pomerantz (Pomerantz (1991) J Biol. Chem. 241:161-8). Briefly, crude extracts were dissolved in DMSO at a concentration of 30 mg/mL. Samples were then diluted 1:10 in potassium phosphate buffer pH 6.8. Further dilutions were performed in 10% DMSO/buffer. For large-scale screening, the assay was converted to a 96 well format. Sample test wells consisted of 50 μ L buffer, 50 μ L of 0.5 mg/mL extract, 50 μ L of 2 mM L-dopa and 50 μ L of 50 U/mL mushroom tyrosinase. Positive control consisted of the above, except sample was replaced with 10% DMSO/buffer. The substrate was added last, with a 12 channel multi-well pipette to initiate the reaction. The plate was read immediately in a 96 well plate reader at 450 nm to detect the formation of dopachrome. The plate was then incubated at room temperature and read again exactly one minute later. The change in absorbance was linear for 2 minutes. Control rate was determined to be optimal at Δ 0.2 A/min. at 450 nm. The percent inhibition for test samples was calculated using the following formula:

$$\text{Percent Inhibition} = (R_c - R_s) / R_c \times 100$$

R_c: Δ absorbance/minute at 450 nm without sample (control)

R_s: Δ absorbance/minute at 450 nm with sample

Crude organic and aqueous plant extracts were tested against purified mushroom tyrosinase in the 96 well plate format. The concentrations of L-Dopa substrate and tyrosinase enzyme were scaled down linearly using a modified method of Pomerantz. Figure 11 depicts the tyrosinase inhibition results of 396 organic extracts derived from various plant species. Of 774 plant extracts, there were 43 extracts which showed >60% inhibition (5.6% positive hits); 6 plants were identified with active fractions that have an IC₅₀<100 μ g/mL (0.78% confirmed hits); and 6 active compounds were isolated and identified.

Example 9. Screening HTP Fraction Library for Inhibitors of COX Peroxidase

Individual bioactive organic and aqueous extracts from Example 7, were further characterized by examining each of the HTP fractions for the ability to inhibit the peroxidase activity of both the COX-1 and COX-2 recombinant enzymes using the method described in Example 7. Figure 12 depicts the broad wavelength UV chromatogram of HTP fractions of the aqueous extract of *Camellia sinensis* (P0605). The representative COX inhibitory results

WO 03/002134

PCT/US02/20602

43

are depicted in Figure 13, which demonstrates the inhibition of COX-2 and COX-1 activity by HTP fractions from *Camellia sinensis* (P0605), generated as described in Examples 3 and 6. The profile depicted in Figure 13 shows a peak of inhibition that is located between fractions C4 to E4 in a total of 16 fractions with certain level of selectivity for COX-1. Both the COX-1 and COX-2 enzymes demonstrate multiple peaks of inhibition suggesting that there is more than one compound contributing to the initial inhibition profiles of the aqueous extract from *Camellia sinensis* (P0605).

Example 10. Generation of a Database Comprised of Structures and Spectroscopic Characteristics

A database comprised of 250 pure natural products with representative structure types in a quantity of 5-500 mg and a purity of >90% (HPLC) was generated by internal isolation of the compounds and by purchasing the compounds from commercial sources, such as Sigma, Indofine, and Chromadex. Each compound was dissolved in methanol (1 mg/mL). Further dilution and concentration may be necessary for individual compounds due to different UV absorption and mass ionization properties. The sample solutions were analyzed by HPLC using a Luna C18 column (2x50 mm, 3 μ m) at a flow rate of 0.4 mL/min and a temperature of 35°C. The column was eluted in 8.5 minutes with a gradient system of 10% to 90% acetonitrile (ACN) in water from 0-4 minutes, 100% ACN from 4.1 to 6.0 minutes and equilibrated between 6.1 to 8.5 minutes with 10% ACN in water. The eluent was analyzed with a Photo Diode Array detector with wavelength from 200-500 nm; and ion trap MS under the following conditions: detector 475 v, focus 35 v, drift 40 v, SSI chamber 0.5 kv, aperture 1 150°C, aperture 2 120°C, cover plate 250°C and negative or positive detection. The retention time, UV spectrum, molecular ion and fragmentations were recorded and saved in a searchable library. Table 8 sets forth the typical information included in the Structures and Spectroscopic database. In the dereplication process, unknown fractions were analyzed under the same conditions and the HPLC peaks from PDA detection were searched in the UV library for structural skeleton and compound type. The molecular ion and retention time were used to identify known compounds by searching the Dictionary of Natural Products and the NERAC database.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

44

Example 11. Dereplication of the HTP Fraction Library for Inhibitors of COX Peroxidase

The dereplication process was initiated after the bioassay results from the HTP plates were obtained. The results are set forth in Figure 13, which shows that the COX inhibitory activity resided in fraction C4 to fraction E4 in a total of 16 fractions. Those fractions were analyzed individually on LC/PDA/MS as described in Example 10. The results are illustrated in Figure 14, which depicts the online PDA/MS Base Ion Chromatogram (BIC) of bioactive fraction D3. Figures 15A and 15B depict the UV and MS chromatogram of fraction D3 analyzed off-line after the fraction was collected. The molecular ion spectra for fraction D3 were identical regardless of whether the analysis was performed online or off-line, as shown in the Figure 16A. Based upon a search of the Structure and Spectroscopic library using the experimental data and information obtained from the Dictionary of Natural Products, fraction D3 contained one major known compound Epigallocatechin Gallate (EGCG) (Figure 16B), which is a well known COX inhibitor. Using the same strategy, all 16 active HTP fractions were dereplicated and found to contain known catechins and flavonoids as illustrated in the Figure 17.

Example 12. Dereplication of the HTP Fraction Library for Inhibitors of Tyrosinase

Inhibition of melanogenesis was determined by a modified method of Siegrist and Eberle (x). B16 F1 mouse melanoma cells (2.0×10^4 cells/mL) were subcultured in GibcoBRL Modified Eagle Medium (10% FBS, 1% Gibco non-essential amino acids, 1% PSG, 1.5% Gibco vitamin solution). After 3 days incubation (37°C, 5% CO₂) cells were seeded (2500 cells/well, 200 μ L) in 96 well sterile culture plates (Costar) and incubated overnight (37°C, 5% CO₂). The next day, cell culture medium was replaced with 100 μ L fresh medium. Extract samples were dissolved in DMSO at a concentration of 30 mg/mL and diluted 1:1000 in cell culture medium on separate, sterile, 96 well plates. Samples (50 μ L) were transferred from dilution plates to cell culture plates using a 12 well multi-well pipette. α -Melanocyte stimulating hormone (α -MSH) (Sigma) was added to all positive wells (150 pM, 50 μ L) to stimulate melanogenesis. Sample wells containing no α -MSH were used to determine sample absorbance at 450 nm unrelated to melanin pigment formation as control. Melanin pigment formation was visible after four days. The degree of melanin formation was

WO 03/002134

PCT/US02/20602

45

determined at 450 nm in a 96 well plate reader. Percent inhibition of samples was determined by the formula:

$$\text{Percent inhibition} = \frac{[(\text{Ac MSH}+) - (\text{Ac MSH-})] / [(\text{As MSH}+) - (\text{Ac MSH-})]}{[\text{Ac MSH}+] - [\text{As MSH-}]} \times 100$$

Ac MSH+: Absorbance at 450 nm of cells containing no sample, with MSH

Ac MSH-: Absorbance at 450 nm of cells containing no sample, without MSH

As MSH+: Absorbance at 450 nm of cells containing sample, with MSH

As MSH-: Absorbance at 450 nm of cells containing sample, without MSH

The active organic extract isolated from *Mallotus repandus* (whole plant) (P0368) was fractionated with HTP as described in the Example 5. All of the HTP fractions were tested for tyrosinase inhibitory activity versus cell toxicity and the results are set forth in Figure 18. As can be seen in Figure 18 there are multiple of peaks, indicating the presence of a number of active components in the crude extract. The largest activity peaks, located from fraction C10 to D10, may be due to cell toxicity rather than enzyme inhibition. The most interesting activity resided at the peak between fractions D2 to D7, which had no cell toxicity. The HPLC/PDA/MS analysis of those fractions (Figures 19A-F) showed an increase in negative ion intensity at a retention time 16.33 minutes, which is superimposed with the position of the tyrosinase inhibitory activity. Further analysis of this peak by Ultra Violet and Mass Spectrometry (Figure 19G), indicated that the skeleton of this compound was that of a gallate. Based upon a search of the Structure and Spectroscopic library using the experimental data and information obtained from the Dictionary of Natural Products, it was determined that this peak corresponds to the known polyphenol, Pterocaryanin B. The structure of this compound is set forth in Figure 19H. Polyphenols are well known as having tyrosinase inhibitory activity. Thus, the dereplication process quickly identified that the positive hit from crude extract and HTP fractions was due mainly to a known compound in addition to some cell toxicity from known sources. There was no need to further pursue this plant extract.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

46

Example 13. Isolation and Purification of the Active Free-B-Ring Flavonoids from the Organic Extract of *Scutellaria orthocalyx*

The organic extract (5 g) from the roots of *Scutellaria orthocalyx*, isolated as described in Example 3, was loaded onto a prepacked flash column (120 g silica, particle size 32-60 μm , 25 cm x 4 cm) and eluted with a gradient mobile phase of (A) 50:50 EtOAc:hexane and (B) methanol from 100% A to 100% B in 60 minutes at a flow rate of 15 mL/min. The fractions were collected in test tubes at 10 mL/fraction. The solvent was evaporated under vacuum and the sample in each fraction was dissolved in 1 mL of DMSO and an aliquot of 20 μL was transferred to a 96 well shallow dish plate and tested for COX inhibitory activity. Based on the COX assay results, active fractions #31 to #39 were combined and evaporated. Analysis by HPLC/PDA and LC/MS showed a major compound with a retention time of 8.9 minutes and a MS peak at 272 m/z. The product was further purified on a C18 semi-preparation column (25 cm x 1 cm), with a gradient mobile phase of (A) water and (B) methanol, over a period of 45 minutes at a flow rate of 5 mL/minute. Eighty eight fractions were collected to yield 5.6 mg of white solid. Purity was determined by HPLC/PDA and LC/MS, and comparison with standards and NMR data. $^1\text{H NMR}$: δ ppm. (DMSO- d_6) 8.088 (2H, m, H-3',5'), 7.577 (3H, m, H-2',4',6'), 6.932 (1H, s, H-8), 6.613 (1H, s, H-3). MS: $[M+1]^+ = 271$ m/e. The compound was identified as Baicalein. The IC_{50} for COX-1 was 0.18 $\mu\text{g/mL/unit}$ of enzyme while the IC_{50} for COX-2 was 0.28 $\mu\text{g/mL/unit}$ (Figure 20).

Example 14. *In vivo* Study of COX Inhibitory Activity of a Standardized Nutraceutical Extract

In vivo inhibition of inflammation was measured using two model systems. The first system (ear swelling model) measures inflammation induced directly by arachidonic acid. This is an excellent measure of COX-2 inhibition, but does not measure any of the cellular events which would occur upstream of arachidonic acid liberation from the cell membrane phospholipids by phospholipase A2 (PLA2). Therefore, to determine how inhibitors function in a more biologically relevant response the air pouch model was employed. This model utilizes a strong activator of complement to induce an inflammatory response that is

WO 03/002134

PCT/US02/20602

47

characterized by a strong cellular infiltrate and inflammatory mediator production including cytokines as well as arachidonic acid metabolites.

The ear swelling model is a direct measure of the inhibition of arachidonic acid metabolism as previously described (Greenspan *et al.* (1999) *J. Med. Chem.* **42**:164-172; Young *et al.* (1984) *J. Invest. Dermat.* **82**:367-371). Arachidonic acid in acetone is applied topically to the ears of mice. The metabolism of arachidonic acid results in the production of proinflammatory mediators produced by the action of enzymes such as COX-2. Inhibition of the swelling is a direct measure of the inhibition of the enzymes involved in this pathway. Seven groups of 5 Balb/C mice were given three dosages of test compounds either interperitoneally (I.P.) or orally by gavage, 24 hours and 1 hour prior to the application of arachidonic acid (AA). AA in acetone (2 mg/15 μ L) was applied to the left ear, and acetone (15 μ L) as a negative control was applied to the right ear. After 1 hour the animals were sacrificed by CO₂ inhalation and the thickness of the ears was measured using an engineer's micrometer. Controls included animals given AA, but not treated with anti-inflammatory agents, and animals treated with AA and indomethacin (I.P.) at 5 mg/kg.

The results are set forth in Figure 21, which shows the effects of three extracts delivered either orally by gavage or interperitoneally (IP) at two time points (24 hours and 1 hour). Free-B-Ring Flavonoids isolated from *S. baicalensis* inhibited swelling when delivered by both IP and gavage although more efficacious by IP. (Figures 21A and 21B). Free-B-Ring Flavonoids isolated from *S. orthocalyx* inhibited the generation of these metabolites when given IP, but not orally, whereas extracts isolated from *S. lateriflora*, while being efficacious *in vitro*, had no effect *in vivo* (data not shown).

Example 15. Development of a Natural COX-2 Inhibitor as a Nutraceutical Product as Result of the PhytoLogix™ Platform

The PhytoLogix™ process has been used for years to screen thousands of plant extracts in order to find novel nutraceutical ingredients containing the chemical characteristics of COX-II inhibitors. A library of 1230 plant extracts was screened against multiple enzymatic and cell type assays for natural COX-2 inhibitors with 1.8% positive hits. The 22 active extracts were further examined using the high throughput purification system described above and the isolated pure compounds were tested using the COX assays

WO 03/002134

PCT/US02/20602

.48

described above. The biological activities of the pure compounds and plant extracts were confirmed with ovine COX-1 and COX-2 enzymes, human COX-2 enzyme, bee venom PLA2, Human 5-LO, human peripheral blood cells, and THP-1 cell line assays. Those extracts that were determined to be efficacious based on *in vitro* models, were then tested for the ability to inhibit inflammation *in vivo* using a both air pouch and topical ear-swelling models when administered by multiple routes (IP and oral). To date, these studies have resulted in the identification of Free-B-Ring flavonoids and flavans as anti-inflammatory agents, with activities through all levels of testing.

These extensive efforts have lead to the discovery of a novel composition of matter, referred to as UninvestinTM, which is described in U.S. Patent Application Serial No. 10/104,477, filed March 22, 2002, entitled "Isolation of a Dual Cox-2 and 5-Lipoxygenase Inhibitor from Acacia." This composition of matter is comprised of a blend of two classes of specific compounds, Free-B-Ring Flavonoids and flavans. This composition of matter not only directly inhibits the COX-2 enzyme, but also inhibits 5-lipoxygenase activity and has demonstrated to have an impact at the gene expression level. The ability of UninvestinTM to inhibit the inflammatory process has been demonstrated in four levels of testing models that include gene expression, purified enzymes, cell based assays and *in vivo* animal models. The efficacy of this product has been evaluated against pharmaceutical drugs and other standardized plant extracts. With respect to inhibition of COX-2, in general, UninvestinTM performs 8-10 times better than ibuprofen and is equivalent or better *in vivo* than indomethacin, a potent anti-inflammatory available by prescription only. Additionally, UninvestinTM has advantages over these two drugs in that it also inhibits the production of LTB4 in cells undergoing an inflammation response, whereas ibuprofen and indomethacin may only inhibit release from cells. It is believed that this is the first report of a correlation between Free-B-Ring flavonoids and COX-2 inhibitory activity. It is also believed that this is the first report of flavans inhibiting the 5-LO pathway. This novel blending of two specific classes of compounds for the prevention and treatment of COX-2 and 5-LO mediated diseases and conditions, represents a new class of nutraceuticals for the treatment of several inflammatory diseases. The product and its ingredients have been evaluated for safety on cell and animal models. In the acute protocol, an individually standardized extract containing a high concentration of Free-B-Ring flavonoids and flavans, as well as, the product

WO 03/002134

PCT/US02/20602

49

Univestin™ given at a dosage of 2 grams/kg (20 times over the human daily dose of 500 mg) produced no abnormalities in weight gain, appearance, behavior, gross necropsy appearance of organs, histology of stomach and liver and blood work.

Figure 22 depicts an example of the selling sheet of the nutraceutical product - Univestin™ and Figure 23 is the Certificate Of Analysis (COA) for the product.

Example 16. Phytologix™ Process for the Discovery of Nutraceutical and Cosmetic Products

The Phytologix™ process for the discovery of novel nutraceutical and cosmetic compositions can be illustrated in two separate protocols as set forth schematically in Figures 24 and 25. As shown in Figure 24, the PhytoLogix discovery starts with a collection of thousand medicinal plants stored in a Medicinal Plant Library. A search of the informatic database based on the indications and usages would likely yield 20 to 50 medicinal plants with similar traditional applications. Those plants would then be extracted as described in Example 3 and the organic and aqueous extracts screened against biochemical, biological and gene expression targets that have been developed, preferable in high throughput models, based on the selected targets and indications as described above. If possible, the whole plant library, in the form of extracts and/or HTP fractions, could be screened through the high throughput screening (HTS) system to maximize the potential number of hits. The positive hits would then be subjected to fractionation, dereplication, isolation and re-assay, as described above to enable the identification of the novel active natural products, as illustrated in the above examples. Standardization of the plant extracts and/or enrichment and/or purification would then continue on the basis of the activity profile and chemical fingerprints. Secondary efficacy assays and evaluation of safety and toxicity of the standardized extracts and/or enriched ingredients and/or the pure active compounds on *in vitro* and *in vivo* models would optimize the multiple potentials to a limited number of product candidates.

The Phytologix™ process, as illustrated in the Figure 25, begins with product candidates whose pharmacological, chemical and safety profiles have been created from previous discovery processes. The further search for information on the candidates is focused on intellectual position, original plant sourcing for potential production, market and regulations. These efforts will lead to a conclusion about the novelty of the products, market potential and further development plan. The last phase of development will generate a

WO 03/002134

PCT/US02/20602

50

manufacturing process, quality control methodology, prototype product, further confirmation of efficacy and safety based on the prototype products, clinical evaluation and final product launch.

To make the Phytologix™ process time efficient and cost sensitive, including practical guidelines to direct the product discovery and development efforts, a couple of process control mechanisms have been developed. As shown in the Figure 26, a Phytologix™ task checklist, to be used during the different stages of the discovery and development process, would be helpful to carry out the critical tasks and avoid missing important information and data on the final products. Preparation of a cost and time estimation, as illustrated in the Figure 27 would provide the project manager with a general outline of the labor, budget and time requirements of the whole process. The most critical part of the analysis is the decision making process based on the progress of the project and the conclusions derived from critical data points.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

51

Table 1. Search Results of Medicinal Plants Traditionally Used to Treat Rheumatoid Arthritis and Arthritis

Rheumatoid arthritis		Arthritis	
P0110	Uvaria microcarpa	P0126	Wikstroemia micrantha
P0177	Clerodendrum bungei	P0193	Cajanus
P0340	Zanthoxylum frazineum	P0236	Anemone tomentosa
P0369	Ampelopsis delavayana	P0239	Livistona chinensis
P0412	Peucedanum dielsianum	P0397	Brassica juncea
P0414	Lycopodium japonicum	P0536	Lepidium apetalum
P0437	Sargentodoxa cuneata	P0574	Imperata cylindrica var.major C.E.
P0444	Drynaria baronii	P0582	Ligusticum brachylobum
P0449	Aconitum carmichaeli	P0588	Pharbitis nil

Table 2. Representative Organic and Aqueous Extracts from various plant species

Plant Name (Latin)	Plant Part	ID #	Amount	Organic Extract	Aqueous Extract
<i>Catharanthus Roseus (White)</i>	Whole plants	P0066	60 g	5.16 g	5.49 g
<i>Scutellaria baicaensis</i>	Roots	P0987	60 g	9.18 g	7.18 g
<i>Cassia tora</i>	Seeds	P0124	60 g	10.67 g	7.7 g
<i>Mahonia fortunei</i>	Stems	P0585	60 g	4.17 g	2.26 g
<i>Caesalpinaceae Afzelia</i>	Leaves	P0079	60 g	3.21 g	4.58 g
<i>Gardenia jasminoides</i>	Fruit	P0012	60 g	8.4 g	9.64 g
<i>Albizia julibrissin</i>	Bark	P0430	60 g	5.87 g	2.56 g
<i>Magnolia biondii</i>	Flowers	P0451	60 g	5.91 g	4.17 g
<i>Angiopteris Omeiensis</i>	Rhizomes	P0095	60 g	4.8 g	6.78 g

WO 03/002134

PCT/US02/20602

52

Table 3. Comparison of Organic, Aqueous and Methanol Extracts from Different Plant Materials

ID #	Latin Name	Plant part	Organic Extract (g)	Aqueous Extract (g)	MeOH Extract (g)
P0490	<i>Daphne genkwa</i> Sieb. Et Zucc.	flower	6.178	5.022	1.289
P0491	<i>Magnolia officinalis</i> Rehd. Et Wiis	trunk bark	7.617	2.44	0.485
P0492	<i>Portulaca oleracea</i> L.	whole plant	2.579	6.881	0.577
P0493	<i>Thalictrum glandulosissimum</i>	rhizome	5.356	4.919	0.895
P0495	<i>Crataegus Pinnatifida</i> Bge.	fruit	14.243	8.56	0.39
P0496	<i>Perilla Frotescans</i> (L.) Britt	leaf	3.614	5.197	0.919

Table 4. Cost Analysis of High Throughput Fractionation of Organic Extracts

Items	supply (1 samp)	material price	material unit price	cost/smp	total cost/smp	total cost/fraction
MeOH	105 mL	\$54/20 L	\$0.0027/mL	\$ 0.28	\$15.32	\$ 0.16
EtOAc	40 mL	\$174.05/20 L	\$0.0087/mL	\$ 0.35		
Hexane	40 mL	\$116.88/16 L	\$0.0073/mL	\$ 0.29		
column		\$137/20	\$6.85	\$ 6.85		
deep well		\$200/50	\$4/ea	\$ 4.00		
well mat		\$150/50	\$3/ea	\$ 3.00		
scintillation vial (20 mL)		\$128.55/500	\$0.26/ea	\$ 0.26		
syringe		\$28.64/100	\$0.29/ea	\$ 0.29		
Total cost: \$15.32/sample \$0.16/fraction						

WO 03/002134

PCT/US02/20602

53

Table 5. Cost Analysis of High Throughput Fractionation of Aqueous Extracts

Items	Supply (2 smps)	material price	material unit price	cost/smp	total cost/smp	total cost per fraction
MeOH	550 mL	\$54/20 L	\$0.0027/mL	\$ 0.75	\$10.94	\$ 0.11
THF	100 mL	\$54.70/4 L	\$0.013/mL	\$ 0.65		
autosampler vial	2	\$32/200	\$0.16/ea	\$ 0.16		
filter	2	\$274.34/150	\$1.83/ea	\$ 1.83		
syringe	2	\$28.64/100	\$0.29/ea	\$ 0.29		
scintillation vial	2	\$128.55/500	\$0.26/ea	\$ 0.26		
deep well	2	\$200/50	\$4/ea	\$ 4.00		
well mat	2	\$150/50	\$3/ea	\$ 3.00	\$20.26	\$ 0.21
column	2	\$400/40smp	\$10/smp	\$ 10.00		
column guard	2	\$205/20smp	\$10.26/smp	\$ 10.26		
column holder	2	\$460/ea				
Total cost: \$31.20/sample \$0.32/fraction						

Table 6. Inhibition of COX-2 Peroxidase Activity by Extracts from Representative Plant Species

Plant Source	Inhibition of COX-2 by organic extract	Inhibition of COX-2 by aqueous extract
<i>Scutellaria orthocalyx</i> (root)	55%	77%
<i>Scutellaria baicaensis</i> (root)	75%	0%
<i>Desmodium sambuense</i> (whole plant)	55%	39%
<i>Eucalyptus globulus</i> (leaf)	30%	10%
<i>Murica nana</i> (leaf)	90%	0%

WO 03/002134

PCT/US02/20602

54

Table 7. IC₅₀ Values for Human and Ovine COX-2 and COX-1

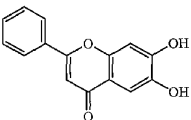
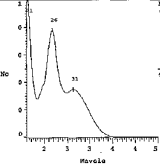
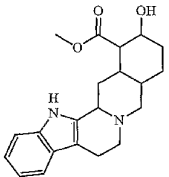
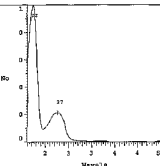
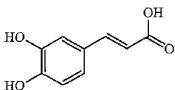
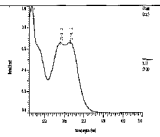
Plant Source	IC ₅₀ Human COX-2 ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ Ovine COX-2 ($\mu\text{g/ML}$)	IC ₅₀ Ovine COX-1 ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Scutellaria orthocalyx</i> (root)	ND	10	10
<i>Scutellaria baicalensis</i> (root)	30	20	20
<i>Scutellaria lateriflora</i> (whole plant)	20	30	80
<i>Eucalyptus globulus</i> (leaf)	ND	50	50
<i>Murica nana</i> (leaf)	5	6	7

WO 03/002134

PCT/US02/20602

55

Table 8. Typical information in the Structure and Spectroscopic Database

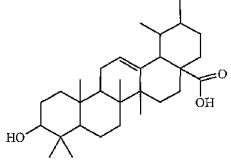
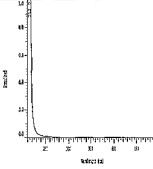
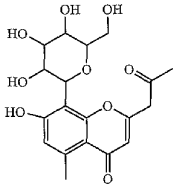
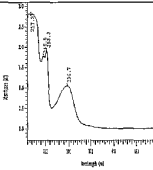
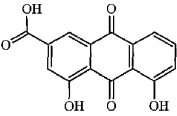
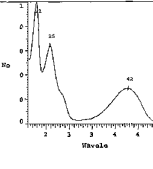
Type	Name	MW	Structure	UV spectra
Flavonoids	7,8-Dihydroxy-flavone	254.24	<p>[480-40-0]</p> 	 <p>Rt = 4.96 min.</p>
Alkaloids	Corynanthine	354.45	<p>[483-10-3]</p> 	 <p>Rt = 5.47 min.</p>
Caffeic acids	Caffeic acid	180.16	<p>[331-39-5]</p> 	 <p>Rt = 0.93 min.</p>

WO 03/002134

PCT/US02/20602

56

Table 8. contd.

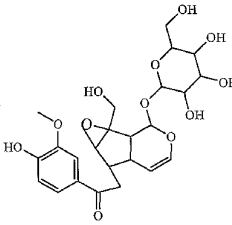
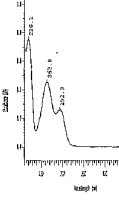
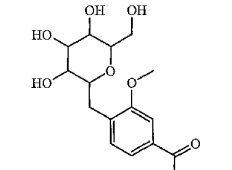
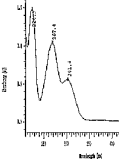
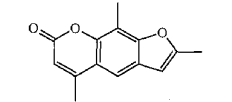
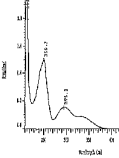
Terpenoids	Ursolic acid	456.70	<p>[77-52-1]</p> 	 <p>Rt = 6.45 min.</p>
Chromones	Aloesin	394.38	<p>[30861-27-9]</p> 	 <p>Rt = 0.96 min.</p>
Anthraquinones	Rhein	284.2	<p>[478-43-3]</p> 	 <p>Rt = 3.92 min.</p>

WO 03/002134

PCT/US02/20602

57

Table 8. contd.

Iridoids	Picroside II	512.47	<p>[39012-20-9]</p> 	 <p>Rt = 3.79 min.</p>
Acetophenones	Androsin	328	<p>[531-28-2]</p> 	 <p>Rt = 1.15 min.</p>
Coumarins	Trioxsalen	228.24	<p>[3902-71-4]</p> 	 <p>Rt = 5.12 min.</p>

WO 03/002134

PCT/US02/20602

58

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method for discovering and developing novel therapeutic pharmaceutical, nutraceutical and cosmetic agents comprising the steps of:
 - (a) identifying and collecting a biological sample;
 - (b) extracting the sample using a two solvent system extraction procedure;
 - (c) separating the extracts using two separate high throughput (HTP) fractionating methods and simultaneously determining the activity of each HTP fraction;
 - (d) dereplicating the active fractions to identify the compounds present; and
 - (e) generating an indication, pharmacological and safety profile for each novel compound identified in step (d).

2. The method of claim 1 wherein the biological sample is selected from the group consisting of materials of botanic, microbial, fungal, mineral, marine, animal or human origin.

3. The method of claim 2 wherein said biological sample is a plant.

4. The method of claim 1 wherein the quantity of sample collected is from 1 gram to 10000 grams.

5. The method of claim 1 wherein said sample is selected based upon documented medicinal usage or mechanism of action.

6. The method of claim 1 further including the step of preparing a collection form for each sample collected.

7. The method of claim 6 wherein said collection form contains specific information about the sample including Latin name, distribution, collection location, therapeutic information, traditional preparations, botanical identification and published references.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

59

8. The method of claim 7 wherein the information on said collection form is transferred to a database.
9. The method of claim 8 wherein the database is selected from the group of databases consisting of customized Access, Oracle, Postgresql, Mysql and Sequel.
10. The method of claim 8 wherein the information in the database is stored in an individual table entered using an individual form.
11. The method of claim 8 further including the step of designing specific macros and queries to assess the of information and data stored in the database.
12. The method of claim 1 further including the step of preparing at least two specimen vouchers for each sample collected, wherein said specimen vouchers are comprised of dried, and/or preserved naturally and/or chemically the whole body of the sample including the full reproduction organs and wherein a taxonomy form is attached to each voucher specimen for purposes of identification.
13. The method of claim 1 wherein the solvent extraction procedure of step (b) further comprises the steps of:
- (a) grinding an appropriate amount of sample;
 - (b) extracting the ground sample with a combination of two organic solvents, wherein said combination is comprised of a solvent of low polarity and a solvent of high polarity;
 - (c) drying the sample after organic extraction;
 - (d) extracting the dried sample with an aqueous solvent; and
 - (e) evaporating the solvent from both extractions and isolating the extract.
14. The method of claim 13 wherein the amount of sample is selected from 1 gram to 1000 grams.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

60

15. The method of claim 13 wherein said low polarity is selected from the group consisting of an alkane having 6-10 carbons, a halogenated alkane having 1-4 carbon atoms, wherein each carbon atom has 1-4 halogen atoms, an ester having the formula $R'COOR''$, wherein R' is selected from an alkyl group having between 1-6 carbons and R'' is selected from an alkyl group having between 1-8 carbons and a ketone having between 3-12 carbons.
16. The method of claim 13 wherein said low polarity solvent is selected from the group consisting of methylene chloride, ethyl acetate and chloroform.
17. The method of claim 13 wherein said high polarity solvent is selected from the group consisting of DMSO, THF and an alcohol wherein said alcohol has one to eight carbons.
18. The method of claim 17 wherein said alcohol is selected from the group consisting of methanol, ethanol, propanols and butanols.
19. The method of claim 13 wherein the quantity of solvents in both extractions is one to ten times the ratio of the weight of the extracted sample.
20. The method of claim 13 wherein the extraction is carried out by a method selected from the group consisting of shaking, sonication, refluxing, stirring, and pressurized mixing, and filtering.
21. The method of claim 1 wherein the extracts obtained from step (b) are prepared for bioassay by a method comprising the steps of
- (a) weighing and dissolving the organic extract into a solvent;
 - (b) weighing and dissolving aqueous extract in a solvent; and
 - (c) transferring each extract solution into individual cell of a sample master plate.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

61

22. The method of claim 21 wherein the solvent for dissolving the organic extract is selected from the group consisting of DMSO, DMF, THF, ketones having three to ten carbons and alcohols having one to five carbons.

23. The method of claim 21 wherein the solvent dissolving the aqueous extract is selected from the group consisting of water, DMSO, DMF, THF, ketones having three to ten carbons and alcohols having one to five carbons.

24. The method of claim 21 wherein the extract concentration in each solution is in the range of 0.01mg to 1000mg per milliliter solvent.

25. The method of claim 21 wherein the sample master plate is selected from the group consisting of a 96, 192, 384, 576, 768, 960, 1152, 1344 and 1536 well plate.

26. The method of claim 1 wherein the separation of the extracts comprises the steps of:

- (a) using a parallel chromatography system or a high throughput purification (HTP) system;
- (b) separating the organic extract with a normal phase pre-packed column;
- (c) separating the aqueous extract with a reverse phase pre-packed column;
- (d) detecting eluent with detector(s)
- (e) collecting fractions; and
- (f) evaporating the solvent.

27. The method of claim 26 wherein the chromatography system is comprised of two to four solvent delivery pumps, solvent mixers, and appropriate auto line switchers.

28. The method of claim 26 wherein the chromatography is carried out at ambient, low, medium or high solvent pressure.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

62

29. The method of claim 26 wherein the chromatography is carried on at ambient, or a temperature from 20 to 80°C.

30. The method of claim 26 wherein the normal phase column is packed with a resin selected from the group consisting of silica gel, alumina, and amino propyl, cyano propyl, diol florasil or polyamide, ion exchange resins.

31. The method of claim 26 wherein the reverse phase column is packed with a resin selected from the group consisting of C-2, C-4, C-8, C-18, LH-20, XAD-4, XAD-16, and polystyrene-divinyl benzene based resins.

32. The method of claims 30 or 31 wherein the particle size of the resin in chromatography column is from 10 to 200 μm .

33. The method of claim 26 wherein the chromatography column is packed with 1 to 500 grams of resin.

34. The method of claim 26 wherein the normal phase chromatography column is eluted with a combination of three organic solvents selected from alkane having six to ten carbons, an organic ester, having the formula R^1COOR^2 , wherein R^1 is selected from an alkyl group having between one to five carbon and R^2 is selected from an alkyl group having between one to six carbons, and an alcohol, having the formula R^3OH , wherein R^3 is an alkyl group having between one to six carbons.

35. The method of claim 26 wherein the reverse phase chromatography column is eluted with a combination of two solvents: DI water and a solvent selected from the group consisting of an alcohol with one to four carbons, acetonitrile, THF, or a ketone having three to twelve carbons.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

63

36. The method of claim 26 wherein the detector is an ultraviolet (UV)/visual light detector comprising single or dual channels with single, continuing or broadband wavelength from 100 - 1000 nm.

37. The method of claim 26 wherein the detector is a MS detector comprising electronic spray ionization or sonic spray ionization chamber; ion trap or single or triple quadruple mass detection with positive or negative mode.

38. The method of claim 26 wherein the detector is a nuclear magnetic resonance (NMR) detector comprising a proton or a carbon probe.

39. The method of claim 26 wherein the detector is a reflex index (RI) detector.

40. The method of claim 26 wherein the detector is a light scattering detector (LSD).

41. The method of claim 26 further comprising the step preparing the extract fractions after step (d) for bioassay using a method comprising the steps of:

- (a) dissolving the fractions from organic extract into a solvent;
- (b) dissolving the fractions from aqueous extract into a solvent; and
- (c) transferring the fraction solution into a sample plate

42. The method of claim 41 wherein the solvent for dissolving the fractions derived from the organic extract and the aqueous extract are independently selected from the group consisting of DMSO, DMF, THF, a ketone containing three to ten carbons, an alcohol containing one to five carbons and a combination of two to three of solvents.

43. The method of claim 41 wherein the extract concentration in the solution is between 0.001 mg to 100 mg/mL of solvent.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

64

44. The method of claim 41 wherein the sample plate is selected from the group consisting of a 96, 192, 384, 576, 768, 960, 1152, 1344 and 1536 well plate.

45. The method of claim 1 wherein the dereplicating of the active fractions comprises the steps of:

- (a) collecting activity data of the sample;
- (b) collecting physical property, spectroscopic and structural data of the sample;
- (c) analyzing the collected data;
- (d) searching commercial databases for the properties of the sample; and
- (e) reaching a conclusion regarding the active fractions.

46. The method of claim 45 wherein the activity measured is selected from the group consisting of enzyme inhibition, receptor binding, gene expression, cell function regulation, protein production, animal function regulation and animal physiological, neurological, and behavior function regulation, animal disease model manipulation and other measurements of biological function.

47. The method of claim 45 wherein the activity data is collected from extracts, fractions of extracts, purified compounds, semi-synthetic and synthetic compounds.

48. The method of claim 45 wherein the physical property data collected in the dereplication process is selected from retention time from a chromatogram based on absorption or changes of UV/VIS, refractive index, laser light scattering pattern, solvent elution volume, mass weight; pH, solubility and log P.

49. The method of claim 45 wherein the spectroscopic information collected is selected from UV/VIS spectrum, mass spectrum including molecular ion and fragmentation ions, NMR spectrum and light scattering spectrum.

50. The method of claim 45 wherein structural information is selected from mass fragmentation pattern and mass spectrum of daughter/grand daughter ions; chemical shifts of

WO 03/002134

PCT/US02/20602

65

protons, carbons, phosphorous, and other elements from one and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopic data; infrared spectrum and UV absorption spectrum.

51. The method of claim 45 wherein the physical property, spectroscopic and structure data is collected during separation of the extracts by splitting a fraction of eluent into one or more detectors.

52. The method of claim 45 wherein the physical property, spectroscopic and structure data are be collected by high pressure liquid chromatography (HPLC) from analysis of the individual fraction.

53. The method of claim 52 wherein the HPLC is comprised of two solvent pumps, a solvent mixer, a stainless steel column containing resin, a column oven and one or more detectors.

54. The method of claim 53 wherein the column is packed with a normal phase resin selected from the group consisting of silica gel, alumina, polyamide, amino propyl, cyano propyl, diol florasil and ion exchange resins.

55. The method of claim 53 wherein the column is packed with a reverse phase resin selected from the group consisting of a C-2, C-4, C-8, C-18, LH-20, XAD-4, XAD-16 and polystyrene-divinyl benzene based polymer.

56. The method of claim 53 wherein the particle size of the resin is selected from 1 to 100 μm .

57. The method of claim 53 wherein the chromatography column contains from 0.1 to 50 grams of resin.

58. The method of claim 45 wherein the commercial databases are selected from the group consisting of the Dictionary of Natural Products, Chemical Abstracts Service's

WO 03/002134

PCT/US02/20602

66

Registration File, NAPROLERT, MEDLINE, NERAC, DEREPA and the Bioactive Natural Product Database.

59. The method of claim 1 wherein the novel ingredient is identified by a bioassay directed isolation, purification and identification process.

60. The method of claim 1 wherein the pharmacology profile is the ability to modulate the activity and function of a biological system, biochemical materials, and gene targets.

61. The method of claim 60 wherein the ability to modulate the activity and function is determined from measurement of biological functions selected from the group consisting of enzyme inhibition, receptor binding, gene expression, cell function regulation, protein production, animal function regulation and animal disease model manipulation.

62. The method of claim 61 wherein the gene target is the expression of a disease or metabolism, or physiology related gene.

63. The method of claim 62 wherein the gene or a portion thereof is of human origin.

64. The method of claim 62, wherein the disease-related gene is associated with a disease selected from the group consisting of cardiovascular disease, respiratory disease, disease of the kidney, disease of the liver, disease of the pancreas, gastrointestinal disease, hematological disease, metabolic disease, neurological disease, aging, immune disease, disease of the reproductive system, infectious disease and skeletal disease.

65. The method of claim 62 wherein the disease-related gene is associated with a conditions selected from the group consisting of inflammation, the immune response, energy metabolism, wound healing, allergy, menopause, aging, oxidative stress and cancer.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

67

66. The method of claim 62 wherein the expression of the disease-, metabolism- or physiology-related gene is measured by the level of messenger RNA of such gene.

67. The method of claims 62 wherein the expression of the of the disease-, metabolism- or physiology-related gene is measured by a method selected from the group consisting of Northern blot analysis, dot blot hybridization, DNA microarray hybridization and quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

68. A method of claim 1 wherein the safety profile is determined by measurement of the ability to maintain the normal activity and function of the biological system, biochemical materials, and molecular biology targets while administrating considerable amount of the compound.

69. The method of claim 1 further comprising the step of developing the novel compound identified into a commercially viable product.

70. The method of claim 13 wherein said an aqueous solvent is selected from the group consisting of water, acidic water, basic water and buffer solutions.

71. The method of claim 70 wherein said acid, basic and buffer solutions are selected from organic or inorganic acid, base, and salts at a pH range from one to fourteen.

WO 03/002134

PCT/US02/20602

1/42

LATIN NAME: <i>Delonix elata</i> (Linn.) Gamble					UPL # P0700	
LOCAL NAME: Tiger bean, White guimohur			FAMILY: <i>Caesalpinaceae</i>			
DISTRIBUTION: An avenue tree found in waste places.			RELATED SPECIES: <i>Delonix regia</i>			
			PLANT PART: Flowers			
COLLECTION						
COLLECTOR	LOCATION			DATE	VOUCHER	
Mr. Yadagiri	COUNTRY	India	LATITUDE	17°	17.01.01	266
	PROVINCE	Hayatnagar	LONGITUDE	78°		
	VILLAGE	Hyderabad	ALTITUDE	625 mts		
THERAPEUTICS						
ETHNO INDICATION		PART OF PLANT USED	MODE OF PREPARATION/ ADMINISTRATION		DOSAGE	
Flowers : Infusion prescribed in bronchitis, asthma and malaria		Flowers	Infusion of flowers.		---	
BOTANICAL IDENTIFICATION						
DESCRIPTION	MACROSCOPY			MICROSCOPY	IDENTIFIED BY	
A medium sized tree ; branchlets puberulous.	<i>Leaves</i> 2-pinnate; leaflets 15-22 pairs, glabrous, subsessile, linear-oblong, apiculate. <i>Flowers</i> yellowish white, in terminal corymbiform racemes, pedicels stout. Calyxlobes 5, valvate, subequal. <i>Petals</i> 5, yellowish-white, shortly clawed, margins curled. <i>Stamens</i> 10, exserted, filaments thickened at the base; anthers linear. <i>Ovary</i> pubescent. <i>Pod</i> flat, attenuate at both ends. <i>Bark</i> tolerable smooth, ash-coloured. <i>Wood</i> yellowish-white.			---	Dr. P.Padma Rao, Associate Botanist, Drug Standardization Unit, Hyderabad	
CHEMICAL COMPONENTS: Yellow flowers contain myricetin and its 3-rhamnoside in addition to quercetin, rutin, β -sitosterol, lupeol, gallic acid and sugars. Flower anthers rich source of zeaxanthin.						
PHARMACOLOGY & TOXICITY:						
REFERENCES: 1. Chem. Ind., 1970, 534 ; Curr. Sci., 976, 45, 661. 2. Biochem J. 1966, 101, 250. Chem. Compn. Of yellow and red flowers Curr. Sci. 1967, 36, 376.						

FIG. 1

WO 03/002134

PCT/US02/20602

3/42



FIG. 3

The screenshot shows a Microsoft Access window titled "Plant Log Form" with a menu bar (File, Edit, View, Insert, Format, Records, Tools, Window, Help) and a toolbar. The main area is titled "PLANT INFORMATION OVERVIEW" and includes a "Print Record" button. The form contains several data fields:

- UPI ID: P0272
- Voucher ID: CHIC698
- Fresh Plant Wt (g): 5300
- Dry Plant Wt (g): 1050
- Ground Material Wt (g): 707
- Total Wt Taken (g): 60
- Remaining Wt (g): 647
- Genus: Polygonum
- Species: viviparum
- Identifier: L.
- Family: Polygonaceae
- Plant Part: rhizome
- Plant Status: dry
- Sender: CHIC
- Ethno Indication: boil, carbuncles, dysentery, leucorhea, metrorrhagia, snake bite, traumatic injury

Below these fields is a table titled "STD Extracts Information":

ExtType	NB_No	Wt (g)
OE	KH-67-20-91	16.31
AE	KH-67-20-92	2.67

At the bottom of the form, there are navigation controls for records. The main record navigation shows "Record: 1 of 1" and "1 of 7". A "Comments" field is present with a vertical scrollbar. The bottom status bar shows "Form View" and "Record: 272 of 1151".

FIG. 4

WO 03/002134

PCT/US02/20602

5/42

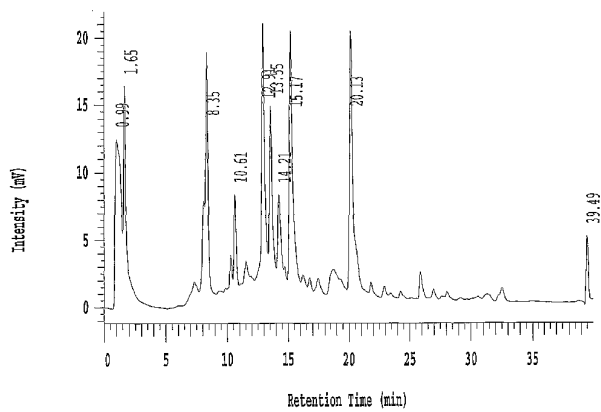


FIG. 5A

WO 03/002134

PCT/US02/20602

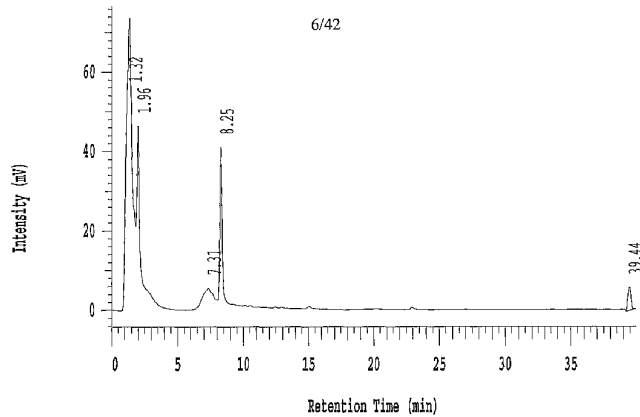


FIG. 5B

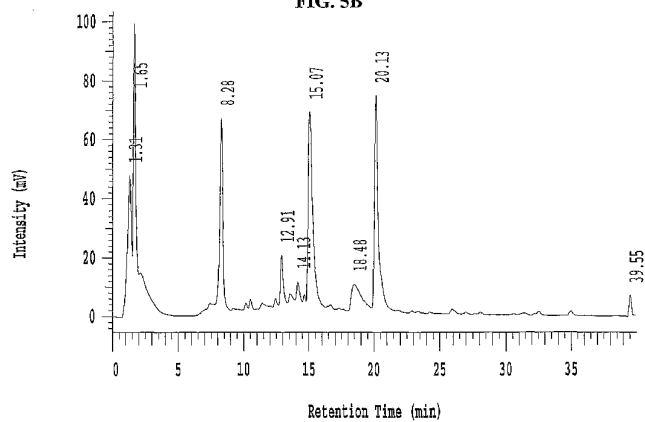


FIG. 5C

WO 03/002134

PCT/US02/20602

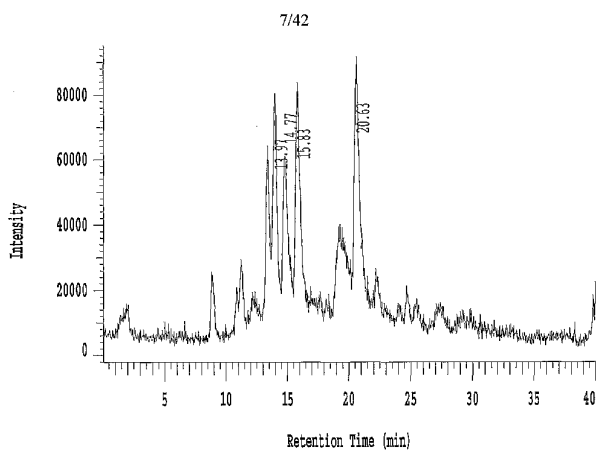


FIG. 6A

WO 03/002134

PCT/US02/20602

S/42

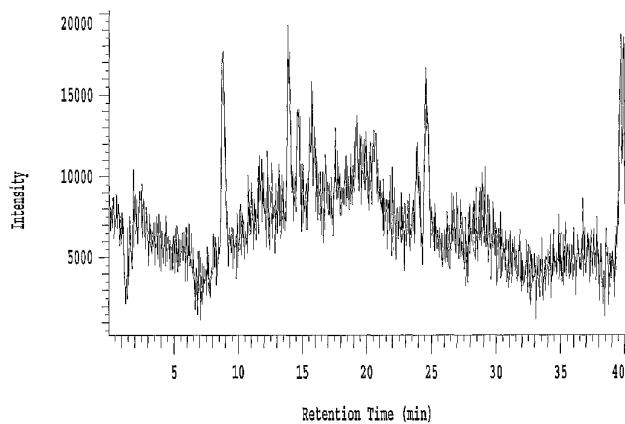


FIG. 6B

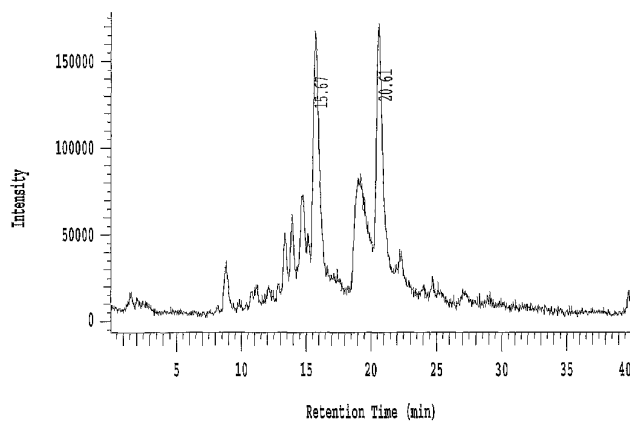


FIG. 6C

WO 03/002134

PCT/US02/20602

9/42

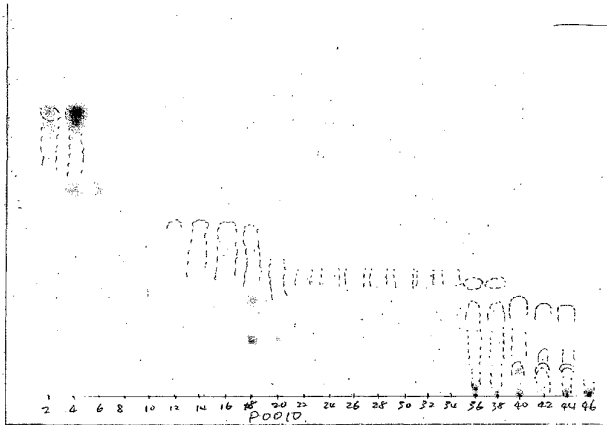


FIG. 7A

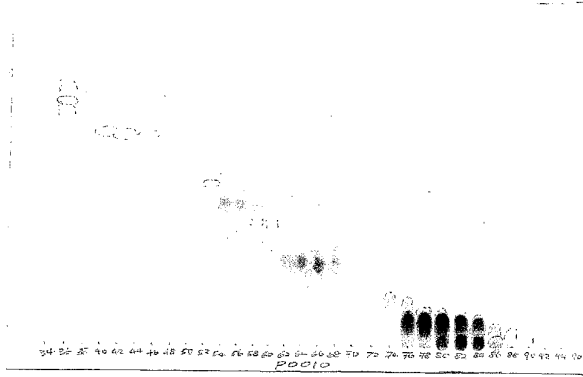


FIG. 7B

WO 03/002134

PCT/US02/20602

10/42

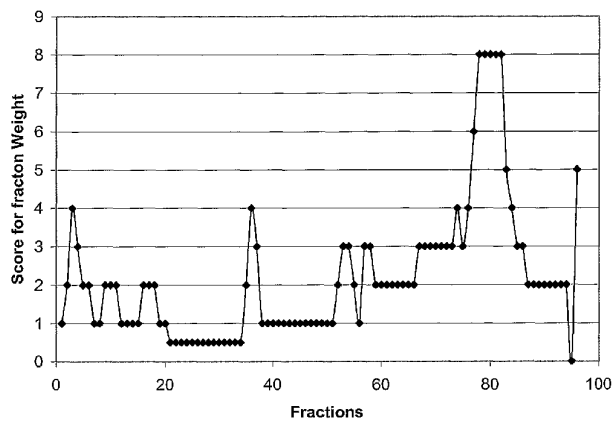


FIG. 8

WO 03/002134

PCT/US02/20602

11/42

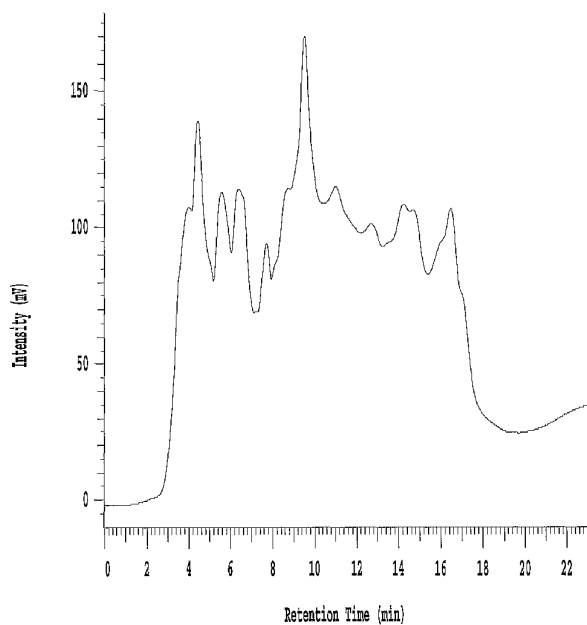


FIG. 9A

WO 03/002134

PCT/US02/20602

12/42

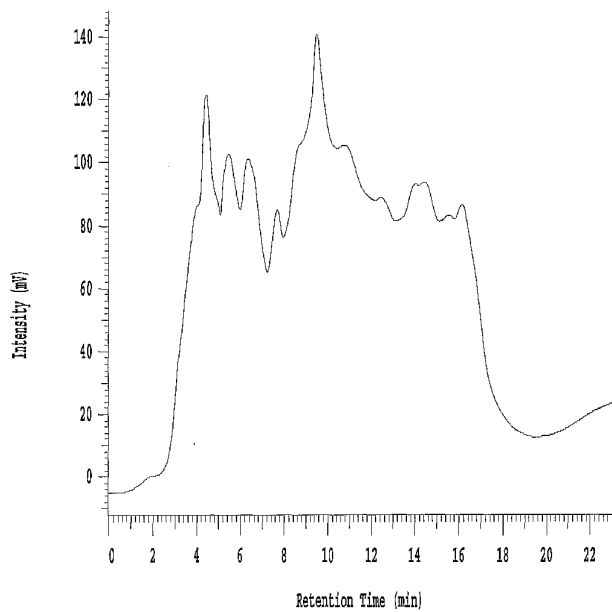


FIG. 9B

WO 03/002134

PCT/US02/20602

13/42

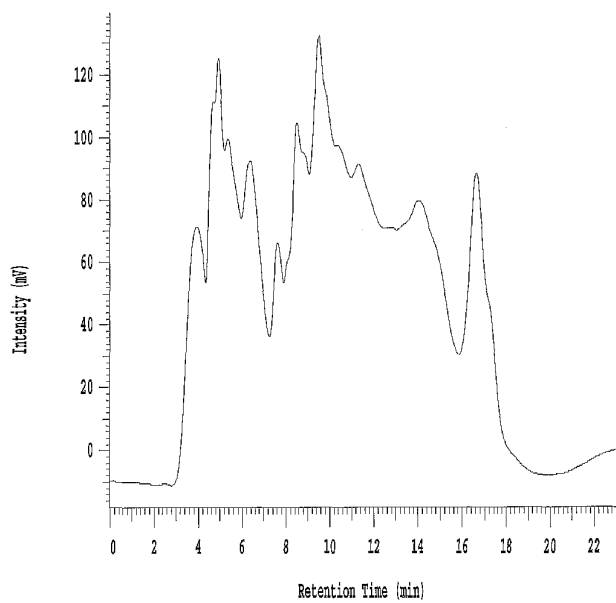


FIG. 9C

WO 03/002134

PCT/US02/20602

14/42

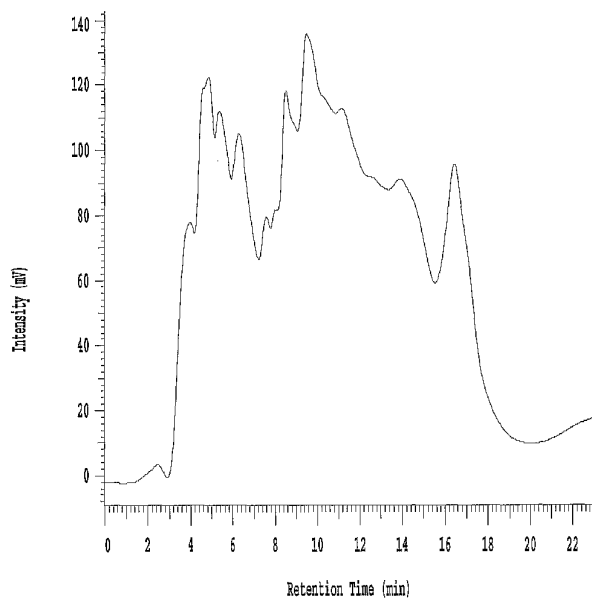


FIG. 9D

WO 03/002134

PCT/US02/20602

15/42

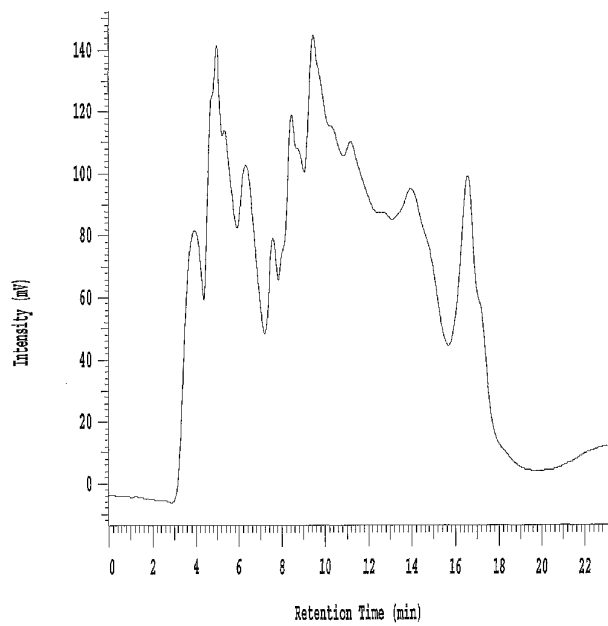


FIG. 9E

WO 03/002134

PCT/US02/20602

16/42

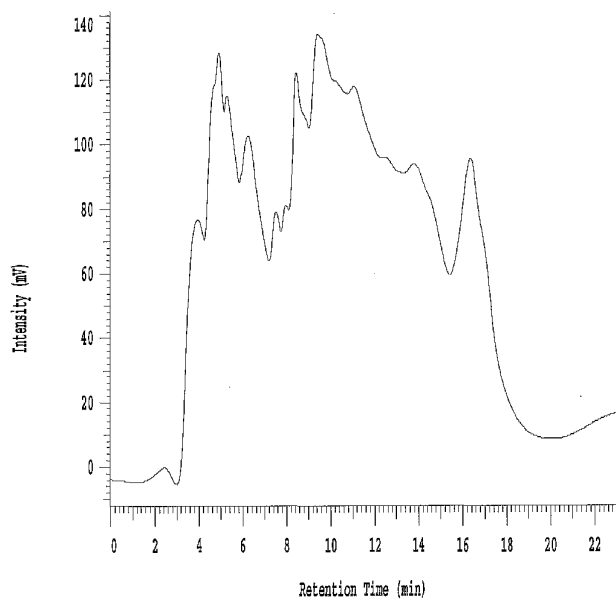


FIG. 9F

WO 03/002134

PCT/US02/20602

17/42

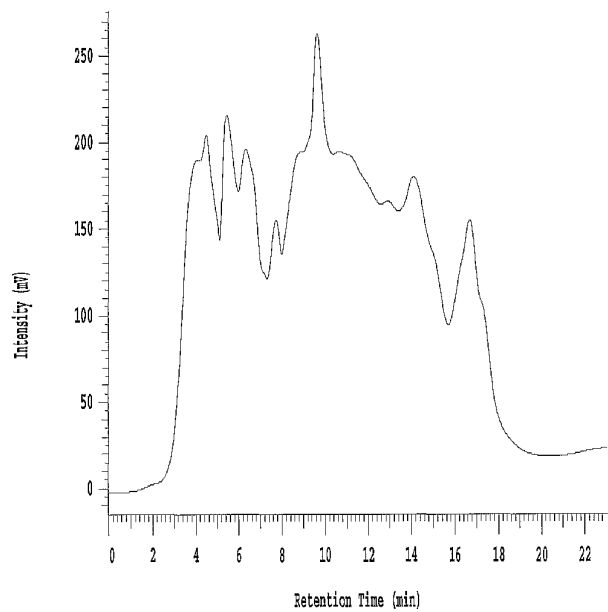


FIG. 9G

WO 03/002134

PCT/US02/20602

18/42

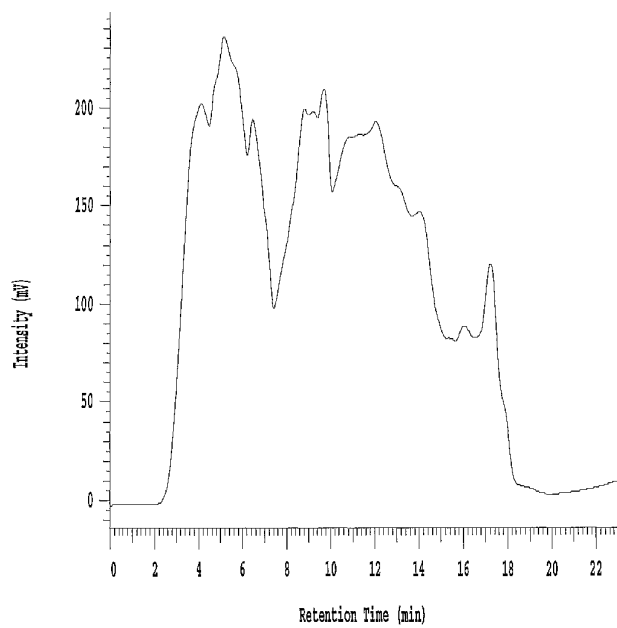


FIG. 9H

WO 03/002134

PCT/US02/20602

19/42

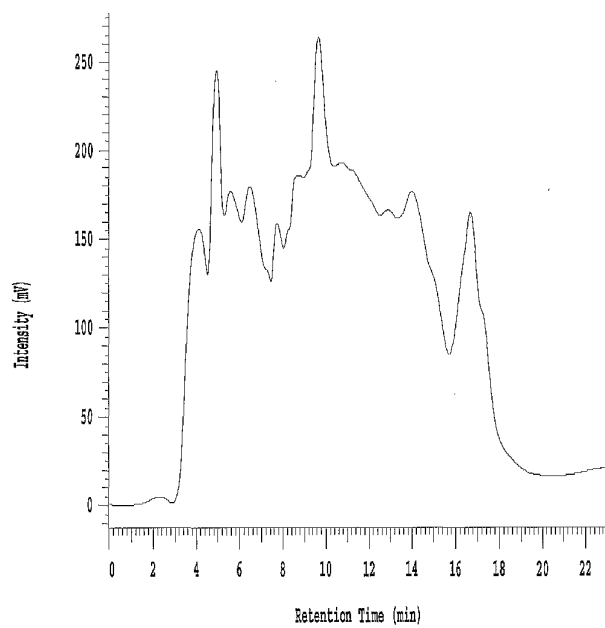


FIG. 9I

WO 03/002134

PCT/US02/20602

20/42

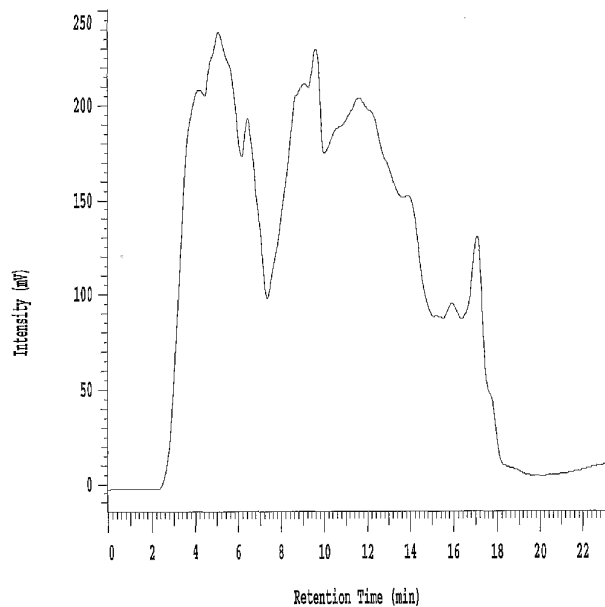


FIG. 9J

WO 03/002134

PCT/US02/20602

21/42

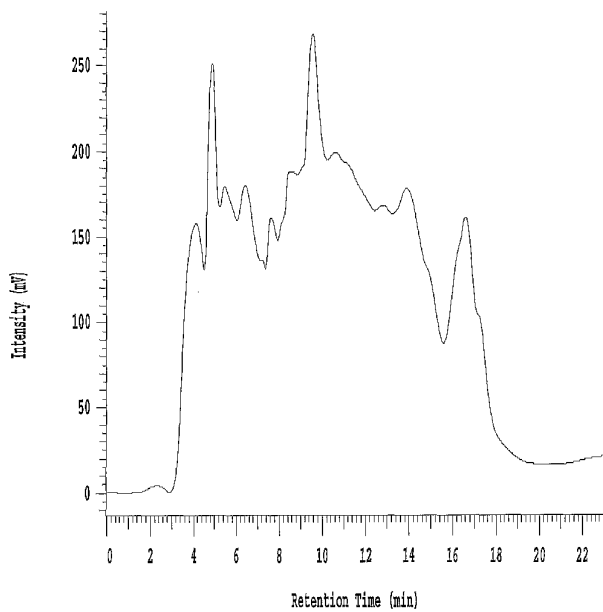


FIG. 9K

WO 03/002134

PCT/US02/20602

22/42

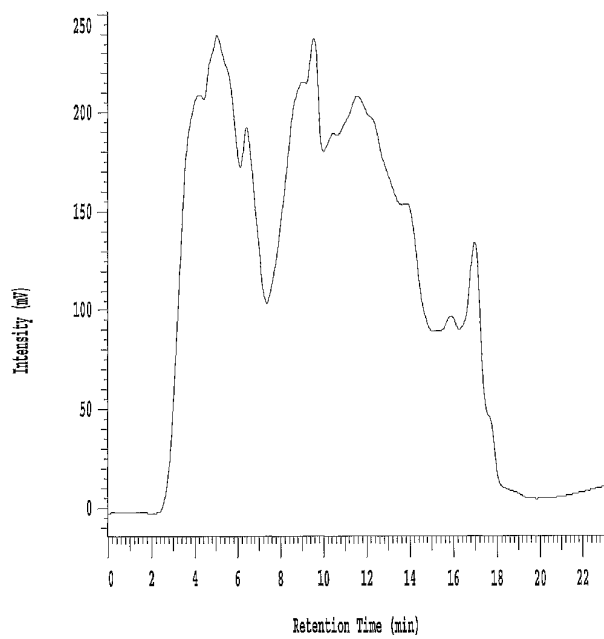


FIG. 9L

WO 03/002134

PCT/US02/20602

23/42

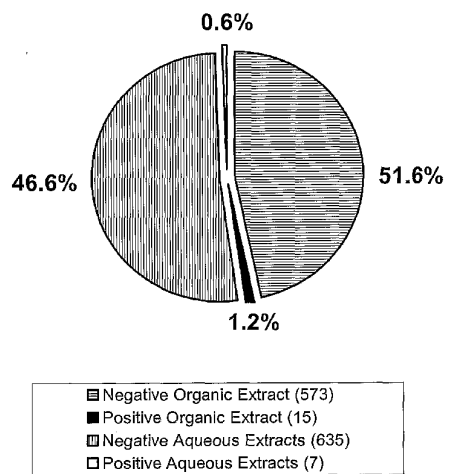


FIG. 10

WO 03/002134

PCT/US02/20602

24/42

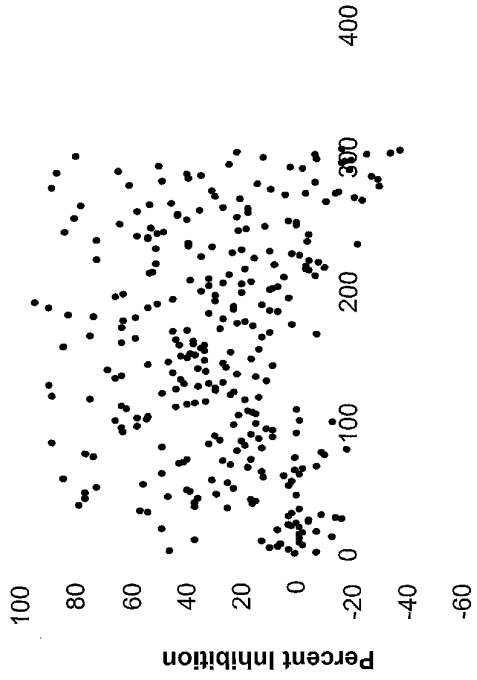


FIG. 11

WO 03/002134

PCT/US02/20602

25/42

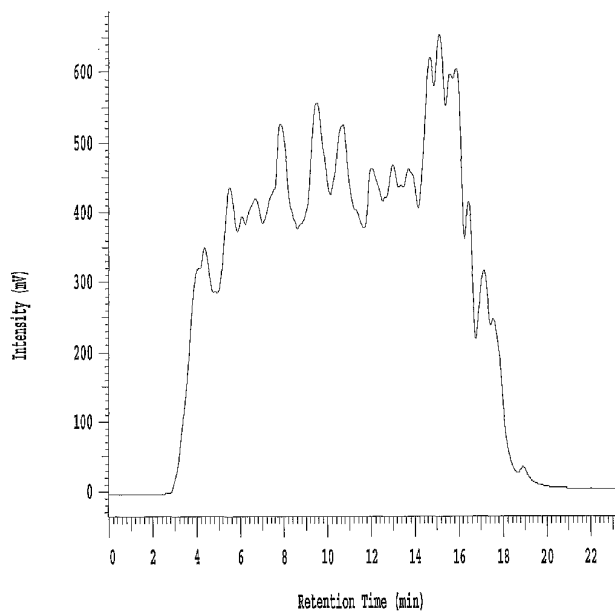


FIG. 12

WO 03/002134

PCT/US02/20602

26/42

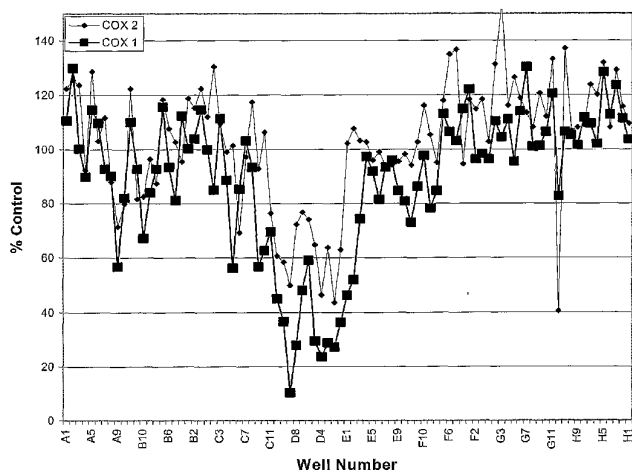


FIG. 13

WO 03/002134

PCT/US02/20602

27/42

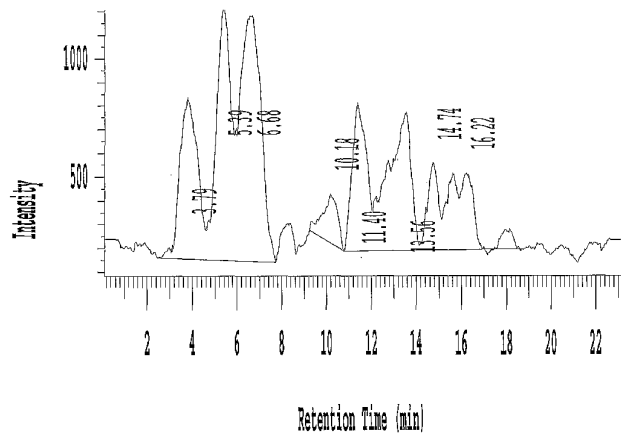


FIG. 14

WO 03/002134

PCT/US02/20602

28/42

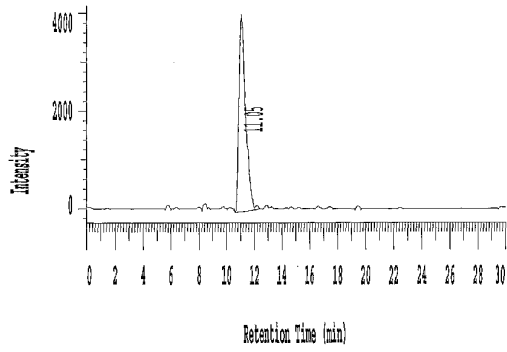


FIG. 15A

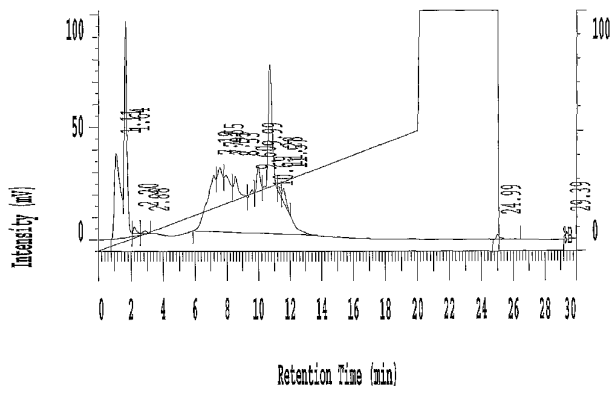


FIG. 15B

WO 03/002134

PCT/US02/20602

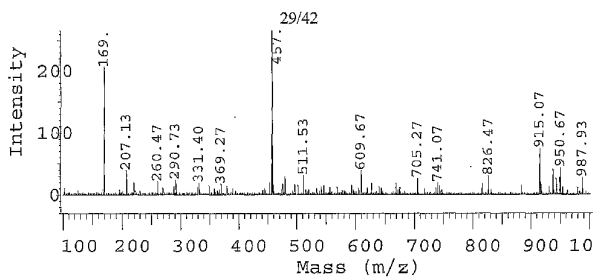


FIG. 16A

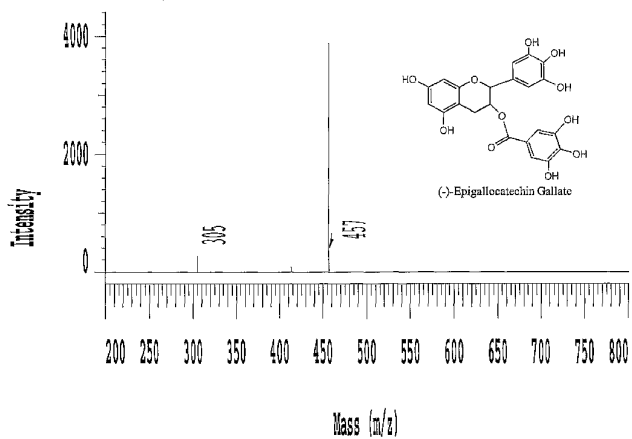


FIG. 16B

WO 03/002134

PCT/US02/20602

30/42

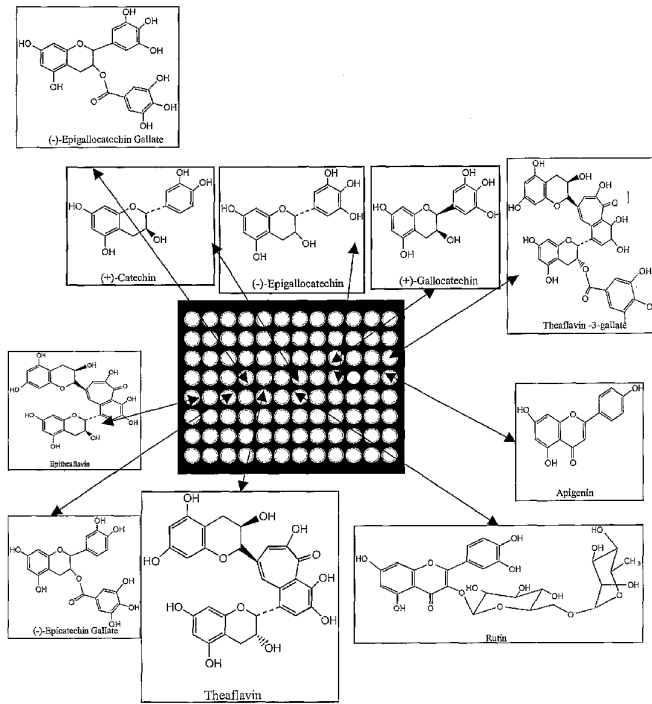


FIG. 17

WO 03/002134

PCT/US02/20602

31/42

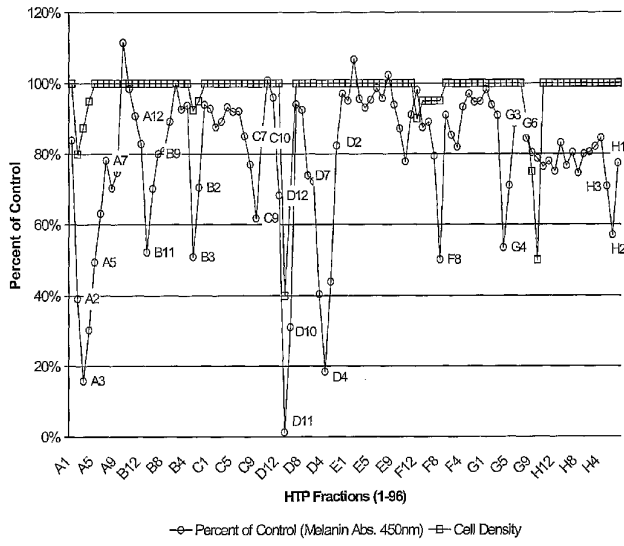


FIG. 18

WO 03/002134

PCT/US02/20602

32/42

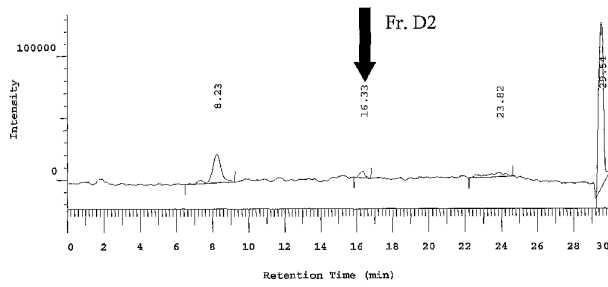


FIG. 19A

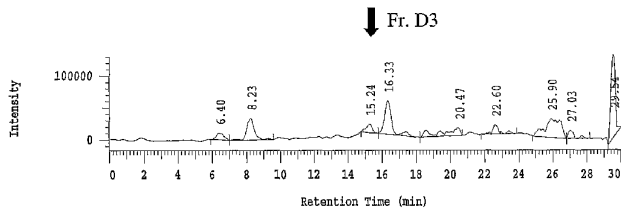


FIG. 19B

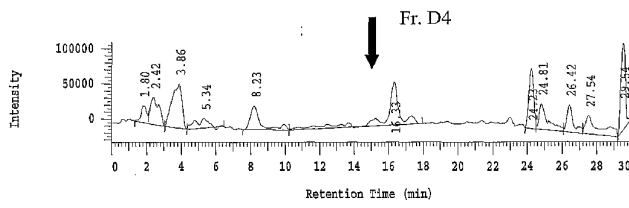
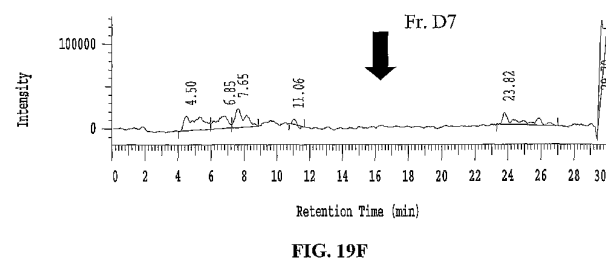
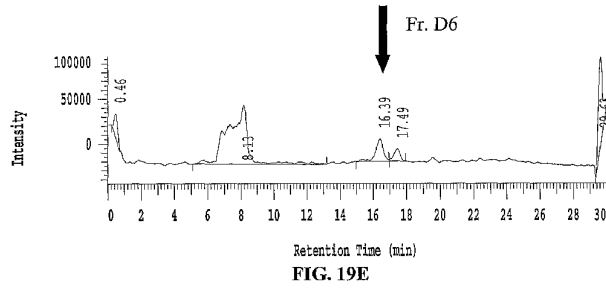
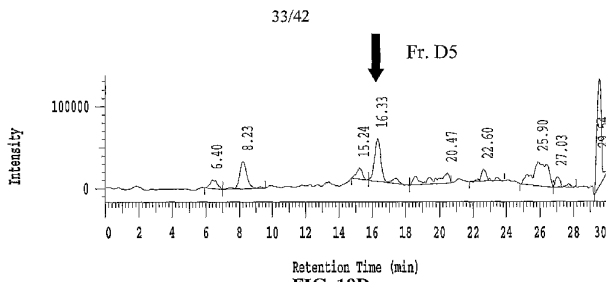


FIG. 19C

WO 03/002134

PCT/US02/20602



WO 03/002134

PCT/US02/20602

34/42

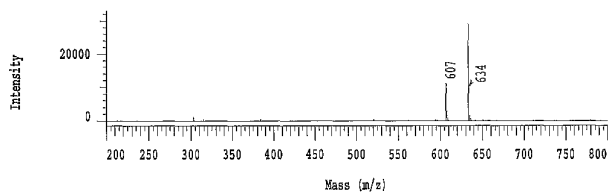


FIG. 19G

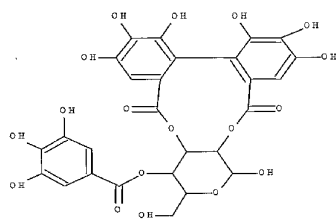


FIG. 19H

WO 03/002134

PCT/US02/20602

35/42

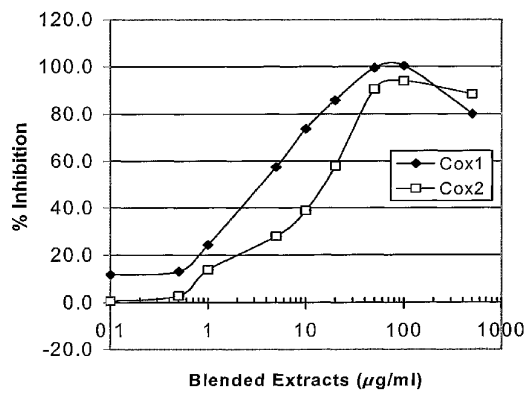


FIG. 20

WO 03/002134

PCT/US02/20602

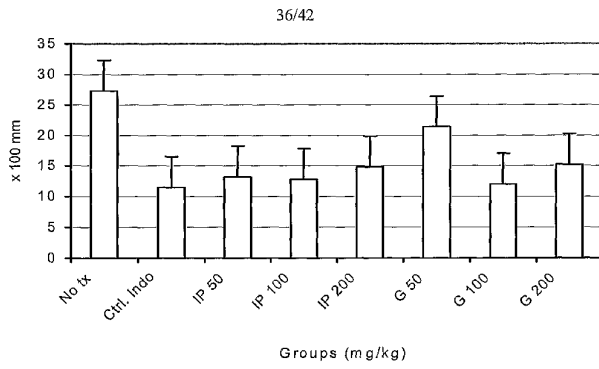


FIG. 21A

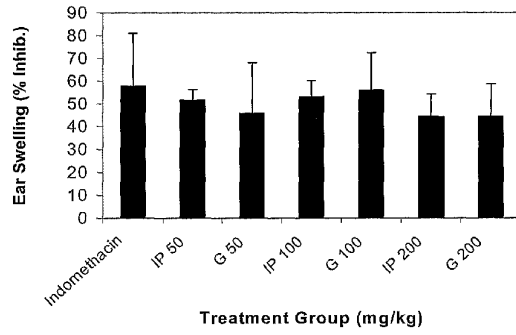


FIG. 21B

UNIVESTIN
Anti-inflammatory

At Unigen, we see things differently.

WE SEE THE ANSWER IN NATURE to provide relief for inflammation

More than 50 years to be filled with inflammation. Particularly in the joints. More than 80 million Americans currently suffer joint discomfort, with those numbers expected to grow as baby boomers age.

Scientists and pharmaceutical researchers have isolated chemical elements, in the form of prescription drugs such as Celebrex®, Vioxx®, and Valdecoxib® that inhibit the body's production of the COX II enzyme and avert the inflammation process before it begins. But as these alternatives become crowded with side effects, the need for natural and safe inflammation inhibitors will grow.

The Strength of Univestin

Unigen Pharmaceuticals has searched for years and screened 1,227 plant extracts to find a botanical compound that combines the chemical characteristics of a COX-II inhibitor. Such effects lead to Univestin, our novel, patent pending, proprietary blend of two classes of specific compounds, flavonoid flavonols and flavones. This product acts on cells directly, inhibits the COX-II enzyme, but also inhibits the 3-lipoxygenase activity and has impact on gene expression level. The ability of Univestin to relieve the inflammatory process has been demonstrated in gene levels of arthritic models that include gene expression, purified enzymes, cell based assays and in vivo animal models.

See for Yourself

To put the scientific power of Unigen Pharmaceuticals to work for you, please contact us. Or to know Univestin, and see the world a little differently.

Physical and Chemical Properties

Color: Yellow to brown
Solubility: Freely soluble in water and polar organic solvents, especially alcohols
Storage conditions: Store in dark at room temperature
Product form: 80 mesh particle size
Product specifications: More than 80% free-B-ling flavonols and 20% flavones
Package size: Available in 25kg increments

Safe and Non-toxic

Univestin has been found to be safe after continuous oral administration in saline for four weeks.

Applications

- Only 400 mg tablets and capsules at 400 mg per day
- Also for use in topical and cosmetic applications

Unigen Pharmaceuticals reserves the right to modify or discontinue this product at any time without notice. See our website for specifications.

UNIGEN
PHARMACEUTICALS, INC.
100 Technology Drive, Suite 100
Greenfield, CO 80021
(800) 438-8163 telephone
(303) 439-9623 fax

Science For A Better World | www.unigenpharma.com

Contact us for full technical specifications on this product.

FIG. 22

WO 03/002134

PCT/US02/20602

38/42

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT: Univestin™
PRODUCT CODE: UP446
ORIGIN: Proprietary blend of standardized
Free-B-Ring Flavonoids and Flavans.
LOT NUMBER: 042602COX-2
DATE OF MANUFACTURE: 042602

TEST	SPECIFICATION	RESULTS
1. Color and Appearance	Yellow Powder	Yellow Powder
2. Free-B-Ring Flavonoids	NLT 60%	62.7%
3. Flavans	NLT 10%	12.2%
4. Moisture	NMT 5.0%	3.8%
5. Particle Size	NLT 90% pass- 80 mesh	93.2%
6. Heavy Metals	NMT 10ppm	Pass
7. Arsenic	NMT 10ppm	Pass
8. Total Coliforms	Non-Detectable	Pass
9. Aerobic Plate Count	NMT 10,000 cfu/g	Pass
10. Mold & Yeast	NMT 1,000 cfu/g	Pass

This is a true and accurate copy of the analytical results obtained for the materials that were used in the manufacturing of this lot of product.

Signed: _____ Date: _____
Susan Vance
Quality Assurance

FIG. 23

WO 03/002134

PCT/US02/20602

39/42

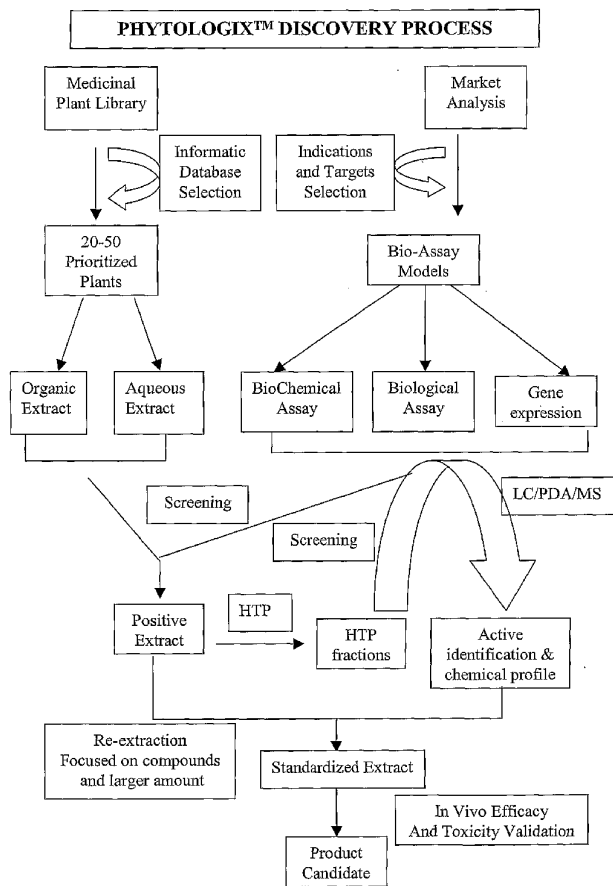


FIG. 24

40/42

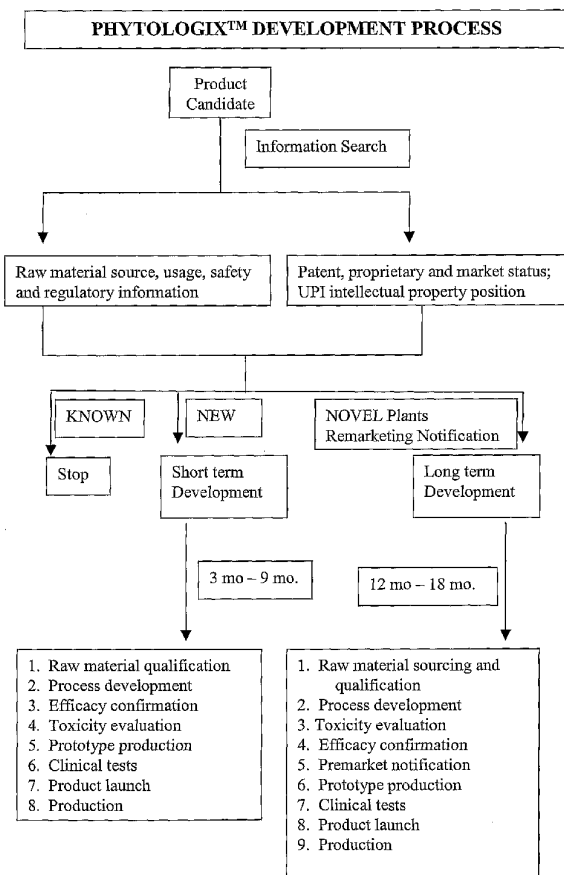


FIG. 25

WO 03/002134

PCT/US02/20602

41/42

PHYTOLOGIX™ TASK CHECK LIST

MARKET AND INFORMATION COLLECTION					
MARKET SURVEY	PRODUCT CONCEPT	INDICATIONS	MECHANISM OF ACTION	INFORMATIC SEARCH	COMPETITOR ANALYSIS
FEASIBILITY STUDY					
PLANT SELECTION	PLANT EXTRACTION	IN VITRO MODEL	ASSAY VALIDATION	COST ANALYSIS	EXTRACT SCREEN
SCREENING AND DISCOVERY					
HIT VALIDATION	HTP FRACTIONATION	SCREEN HTP FRACTIONS	ACTIVE DEREPLICATION	LARGE SCALE ISOLATION	ACTIVE IDENTIFICATION
PRODUCT DEVELOPMENT					
IC50 OF ACTIVES	SECONDARY ASSAY	IN VITRO TOXICITY	STANDARDIZED EXTRACTS	LITERATURE SEARCH	REGULATION & IP EVALUATION
PRODUCT EVALUATION					
EFFICACY CONFIRMATION	IN VIVO TOXICITY	QC METHOD DEVELOPMENT	RAW MATERIAL SOURCING	RAW MATERIAL QUALIFICATION	PROCESS DEVELOPMENT
PRELAUNCH					
PROTOTYPE PRODUCTION	STABILITY STUDY	HUMAN CLINICAL	MARKETING PROFILE	PATENT FILING	PUBLICATION PRESENTATION
LAUNCH					
RAW MATERIAL SUPPLY	MFG PRODUCTION	HUMAN CLINICAL	QUALITY & EFFICACY ASSURANCE	PRODUCT ADVERTISEMENT	PUBLIC RELATIONSHIP

FIG. 26

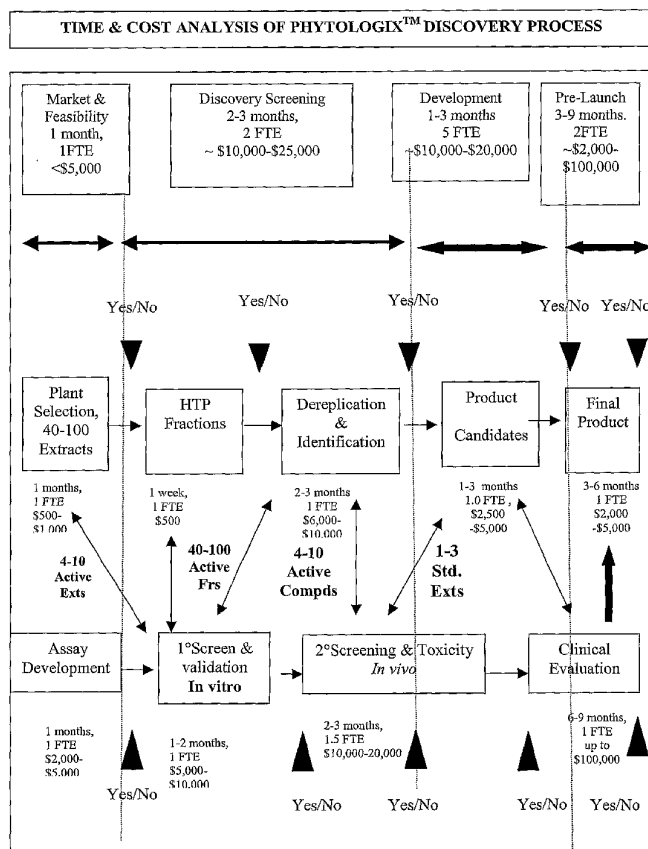


FIG. 27

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. JP 2004-26012
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC Class. (Int. Cl.) US CL. (Int. Cl.) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. (Int. Cl.) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST. STN		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HOOK et al. Approaches to automating the dereplication of bioactive natural products - the key step in high throughput screening of bioactive materials from natural sources. J. Biomolecular Screening, 1997. Vol. 2, No. 3, pages 145-152, see entire document.	1-12, 21-69
Y	STREGE. High-performance liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. J. Chromatography B. 1999. Vol. 725, pages 67-78, see entire document.	1-12, 21-69
Y	US 5,978,804 A (DIETZMAN) 02 November 1999(02.11.99), see entire document.	1-12, 21-69
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the actual state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may (have) (drove) (ing) priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 OCTOBER 2002		Date of mailing of the international search report 21 NOV 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 805-9250		Authorized officer: Allison D. Roberts for CHRISTOPHER TATE Telephone No. (703) 808-6198

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 30/34	G 0 1 N 30/32	A
G 0 1 N 30/46	G 0 1 N 30/34	A
G 0 1 N 30/48	G 0 1 N 30/46	E
G 0 1 N 30/54	G 0 1 N 30/48	G
G 0 1 N 30/62	G 0 1 N 30/48	H
G 0 1 N 30/72	G 0 1 N 30/48	K
G 0 1 N 30/74	G 0 1 N 30/48	M
G 0 1 N 30/84	G 0 1 N 30/48	P
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 30/48	Y
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 30/54	F
	G 0 1 N 30/62	E
	G 0 1 N 30/72	C
	G 0 1 N 30/74	E
	G 0 1 N 30/74	Z
	G 0 1 N 30/84	Z
	G 0 1 N 33/53	Z C C M
	G 0 1 N 37/00	1 0 3

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74) 代理人 100075236

弁理士 栗田 忠彦

(72) 発明者 ジャ, キ

アメリカ合衆国コロラド州 8 0 0 2 7, スーペリオール, ジャスパー・ウェイ 4 7 7

(72) 発明者 ホン, メイ - フェン

アメリカ合衆国コロラド州 8 0 2 3 4, ノースグレン, ウェスト・ワンハンドレッドイレブンス・アベニュー 1 2 2 8

专利名称(译)	制备, 筛选和去复制天然产物文库以发现治疗剂的方法		
公开(公告)号	JP2005504958A	公开(公告)日	2005-02-17
申请号	JP2003508373	申请日	2002-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	尤尼根制药公司		
申请(专利权)人(译)	Yunigen制药公司醋		
[标]发明人	ジャキ ホンメイフェン		
发明人	ジャ,キ ホン,メイ-フェン		
IPC分类号	G01N27/62 A61K36/00 B01J20/281 B01J20/283 B01J20/284 B01J20/285 G01N30/06 G01N30/26 G01N30/32 G01N30/34 G01N30/46 G01N30/54 G01N30/62 G01N30/72 G01N30/74 G01N30/84 G01N30/88 G01N33/53 G01N37/00 G06F19/00 G01N30/48		
CPC分类号	G01N30/88 A61K36/00 C12Q1/025 C40B40/04 G01N30/02 G01N33/5097 G01N33/6842 G01N2030/8813 G01N2500/00		
FI分类号	G01N30/88.E G01N27/62.G G01N27/62.L G01N30/06.Z G01N30/26.A G01N30/32.A G01N30/34.A G01N30/46.E G01N30/48.G G01N30/48.H G01N30/48.K G01N30/48.M G01N30/48.P G01N30/48.Y G01N30/54.F G01N30/62.E G01N30/72.C G01N30/74.E G01N30/74.Z G01N30/84.Z G01N33/53.ZCC.M G01N37/00.103		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/301523 2001-06-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明一般地涉及新的生物活性的治疗剂, 以称为Phytologix™ 用于发现营养制品和化妆品试剂的技术基础。特别地, 本发明包括用于与所述收集和这些植物的药用植物的创建信息数据库的集成系统。本发明还涉及改进的标准化提取和分馏过程, 这个过程是简单的, 分离效率, 库, 该方法的成本低, 并且, 质量令人惊讶的吞吐量方面, 现有技术的提供更显著的优势。本发明通过利用高通量生物测试数据和技术如HPLC / PDA / MS以及国内纯化化合物库提供结构去复制过程的细节。证明本发明比现有技术方法更有效和准确。最后, Phytologix™ 基础, 现实和通过确定新的膳食补充剂或化妆产品的天然COX-2和酪氨酸酶抑制剂的发现和开发的全过程它被认证为一个有效的过程。

		(43) 公表日 平成17年2月17日 (2005.02.17)	
(51) Int. Cl. 7	FI	テーマコード (参考)	
GO 1 N 30/88	GO 1 N 30/88	E	
GO 1 N 27/62	GO 1 N 27/62	G	
GO 1 N 30/06	GO 1 N 27/62	L	
GO 1 N 30/26	GO 1 N 30/06	Z	
GO 1 N 30/32	GO 1 N 30/26	A	
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 167 頁) 最終頁
(21) 出願番号	特願2003-508373 (P2003-508373)	(71) 出願人	504000568
(86) (22) 出願日	平成14年6月27日 (2002.6.27)		ユニゲン・ファーマシューティカル ンコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月25日 (2003.12.25)		アメリカ合衆国ワシントン州9851 ラセイ, ノース・イースト, ウィラ ・ドライブ 2660
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/020602	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開番号	W02003/002134		弁理士 社本 一夫
(87) 国際公開日	平成15年1月9日 (2003.1.9)	(74) 代理人	100076691
(31) 優先権主張番号	60/301,523		弁理士 堀井 忠武
(32) 優先日	平成13年6月27日 (2001.6.27)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭夫