

(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2004-532811

(P2004-532811A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004. 10. 28)

(51) Int. Cl.⁷

A 6 1 K 35/78

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 1/00

A 6 1 P 1/02

A 6 1 P 1/04

F I

A 6 1 K 35/78

A 6 1 K 35/78

A 6 1 K 35/78

A 6 1 K 35/78

A 6 1 K 35/78

X

B

C

D

E

テーマコード (参考)

4 C 0 8 4

4 C 0 8 8

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 142 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-549278 (P2002-549278)

(86) (22) 出願日 平成13年12月13日 (2001. 12. 13)

(85) 翻訳文提出日 平成15年6月16日 (2003. 6. 16)

(86) 国際出願番号 PCT/US2001/048912

(87) 国際公開番号 W02002/047708

(87) 国際公開日 平成14年6月20日 (2002. 6. 20)

(31) 優先権主張番号 09/737, 892

(32) 優先日 平成12年12月15日 (2000. 12. 15)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502427323

ファルマシア・コーポレーション

アメリカ合衆国ミズーリ州63017-1

732, チェスターフィールド, チェス

ターフィールド・パークウェイ・ウエスト

700

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫

(74) 代理人 100076691

弁理士 増井 忠式

(74) 代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74) 代理人 100080137

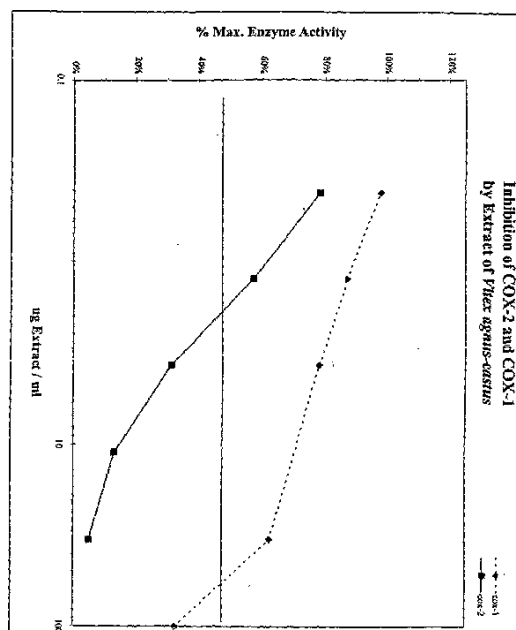
弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 食用植物抽出物による選択的COX-2阻害

(57) 【要約】

本発明は生物におけるCOX-2阻害法に関する。とりわけ、本方法は好ましくは、生物におけるCOX-2選択的阻害法に関する。本方法は、抽出物がCOX-2を阻害する食用植物から分離した有機抽出物を生物に投与するステップを含む。COX-2阻害およびCOX-2選択的阻害を示す組成物の有機抽出物からの精製法もまた提供する。さらに、生物におけるCOX-2により仲介される炎症または炎症性疾患の治療法および/または予防法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物における C O X - 2 の選択的阻害法であって、生物に治療的あるいは予防的有効量の食用植物有機抽出物を含む組成物を投与するステップを含む方法であり、ここで該抽出物の C O X - 2 活性に対する阻害作用が、該抽出物の C O X - 1 に対する活性阻害作用の約 2 倍以上である前記方法。

【請求項 2】

C O X - 2 活性が抽出物の C O X - 1 活性に対する阻害作用の約 10 倍以上である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

生物における C O X - 2 活性阻害法であって、該方法が生物に治療的あるいは予防的有効量の食用植物有機抽出物を含む組成物を投与するステップを含む方法であり、ここで該植物が、Agavales、リンドウ目 (Apocynales)、サトイモ目 (Araceles)、ウマノスズクサ目 (Aristolochiales)、キク目 (Asterales)、フウチョウソウ目 (Brassicales)、サボテン目 (Cactales)、ナデシコ目 (Caryophyllales)、ウリ目 (Cucurbitales)、Elaeagnales、ブナ目 (Fagales)、グネツム目 (Gnetales)、イネ目 (Graminales)、シソ目 (Lamiales)、ユリ目 (Liliales)、アオイ目 (Malvales)、Musales、フトモモ目 (Myrtales)、ケシ目 (Papaverales)、オオバコ目 (Plantaginales)、ナス目 (Polemoniales)、キンポウゲ目 (Ranales)、バラ目 (Rosales)、アカネ目 (Rubiales)、ミカン目 (Rutales)、ゴマノハグサ目 (Scrophulariales)、セリ目 (Umbellales)、イラクサ目 (Urticales)、およびスミレ目 (Violales) からなる目から

10

20

【請求項 4】

抽出物の C O X - 2 活性に対する阻害作用が抽出物の C O X - 1 活性に対する阻害作用の約 2 倍以上である請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

抽出物の C O X - 2 活性に対する阻害作用が抽出物の C O X - 1 活性に対する阻害作用の約 10 倍以上である請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

Agavales 目の有機抽出物がリュウゼツラン科 (Agavaceae) からのものである請求項 3 に記載の方法。

30

【請求項 7】

リュウゼツラン科 (Agavaceae) の有機抽出物がユッカ属 (Yucca) からのものである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

リンドウ目 (Apocynales) の有機抽出物がガガイモ科 (Asclepiadaceae) から選択されるものである請求項 3 に記載の方法。

【請求項 9】

ガガイモ科 (Asclepiadaceae) の有機抽出物がトウワタ属 (Asclepias) からのものである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

サトイモ目 (Araceles) の有機抽出物がサトイモ科 (Araceae) から選択されるものである請求項 3 に記載の方法。

40

【請求項 11】

サトイモ科 (Araceae) から有機抽出物がショウブ属 (Acorus)、サトイモ属 (Colocasias)、およびアメリカサトイモ属 (Xanthosoma) からなる属から選択されるものである請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

ウマノスズクサ目 (Aristolochiales) の有機抽出物がウマノスズクサ科 (Aristolochiaceae) から選択されるものである請求項 3 に記載の方法。

【請求項 13】

50

ウマノスズクサ科 (Aristolochiaceae) の有機抽出物がウマノスズクサ属 (Aristolochia) からのものである請求項12に記載の方法。

【請求項 1 4】

キク目 (Asterales) の有機抽出物がキク科 (Asteraceae) から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 1 5】

キク科 (Asteraceae) の有機抽出物がヨモギ属 (Artemisia)、シオン属 (Aster)、ツルハグマ属 (Blumea)、キクニガナ属 (Cichorium)、Crassocephallum、オオアザミ属 (Silybum)、ノゲシ属 (Sonchus)、およびタンポポ属 (Taaxacum) からなる属から選択されるものである請求項14に記載の方法。

10

【請求項 1 6】

フウチョウソウ目 (Brassicales) の有機抽出物がアブラナ科 (Brassicaceae) から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 1 7】

アブラナ科 (Brassicaceae) の有機抽出物がアブラナ属 (Brassica) およびナズナ属 (Capsella) からなる属から選択されるものである請求項16に記載の方法。

【請求項 1 8】

サボテン目 (Cactales) の有機抽出物がサボテン科 (Cactaceae) から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 1 9】

サボテン科 (Cactaceae) の有機抽出物がサンカクチュウ属 (Hylocereus) からのものである請求項18に記載の方法。

20

【請求項 2 0】

ナデシコ目 (Caryophyllales) の有機抽出物がヒユ科 (Amaranthaceae)、ナデシコ科 (Caryophyllaceae)、ヤマゴボウ科 (Phytolaccaceae) およびタデ科 (Polygonaceae) からなる植物の科から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 2 1】

ヒユ科 (Amaranthaceae) の有機抽出物がアルテルナンテラ属 (Alternanthera) からのものである請求項20に記載の方法。

【請求項 2 2】

ナデシコ科 (Caryophyllaceae) の有機抽出物がハコベ属 (Stellaria) からのものである請求項20に記載の方法。

30

【請求項 2 3】

ヤマゴボウ科 (Phytolaccaceae) の有機抽出物がヤマゴボウ属 (Phytolacca) からのものである請求項20に記載の方法。

【請求項 2 4】

タデ科 (Polygonaceae) の有機抽出物がタデ属 (Polygonum) およびギシギシ属 (Rumex) からなる属から選択されるものである請求項20に記載の方法。

【請求項 2 5】

ウリ目 (Cucurbitales) の有機抽出物がウリ科 (Cucurbitaceae) から選択されるものである請求項3に記載の方法。

40

【請求項 2 6】

ウリ科 (Cucurbitaceae) の有機抽出物がスイカ属 (Citrullus) およびMukiaからなる属から選択されるものである請求項25に記載の方法。

【請求項 2 7】

Eleagnales の有機抽出物がグミ科 (Elaeagnaceae) から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 2 8】

グミ科 (Elaeagnaceae) の有機抽出物がグミ属 (Elaeagnus) からなる属から選択されるものである請求項27に記載の方法。

50

【請求項 29】

ブナ目 (Fagales) の有機抽出物がブナ科 (Fagaceae) から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 30】

ブナ科 (Fagaceae) の有機抽出物がクリ属 (Castanea) からなる属から選択されるものである請求項29に記載の方法。

【請求項 31】

グネツム目 (Gnetales) の有機抽出物がイチョウ科 (Ginkgoaceae) から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 32】

イチョウ科 (Ginkgoaceae) の有機抽出物がイチョウ属 (Ginkgo) からのものである請求項31に記載の方法。

【請求項 33】

イネ目 (Graminales) の有機抽出物がイネ科 (Poaceae) から選択される請求項3に記載の方法。

【請求項 34】

イネ科 (Poaceae) の有機抽出物がジユズダマ属 (Coix)、オヒシバ属 (Eleusine)、オオムギ属 (Hordeum)、イネ属 (Oryza)、およびトウモロコシ属 (Zea) からなる属から選択されるものである請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

シソ目 (Lamiales) の有機抽出物がシソ科 (Lamiaceae) およびクマツヅラ科 (Verbenaceae) から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 36】

シソ科 (Lamiaceae) の有機抽出物がシロネ属 (Lycopus)、メボウキ属 (Ocimum)、シソ属 (Perilla)、ウツボグサ属 (Prunella) およびサルビア属 (Salvia) からなる属から選択されるものである請求項35に記載の方法。

【請求項 37】

クマツヅラ科 (Verbenaceae) の有機抽出物がハマゴボウ属 (Vitex) からなる属から選択されるものである請求項35に記載の方法。

【請求項 38】

ユリ目 (Liliales) の有機抽出物がヤマノイモ科 (Dioscoreaceae) およびユリ科 (Liliaceae) からなる植物の科から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 39】

ヤマノイモ科 (Dioscoreaceae) の有機抽出物がヤマノイモ属 (Dioscorea) からのものである請求項38に記載の方法。

【請求項 40】

ユリ科 (Liliaceae) の有機抽出物がネギ属 (Allium)、ユリ属 (Lilium)、シオデ属 (Smilax)、およびエンレイソウ属 (Trillium) からなる属から選択されるものである請求項38に記載の方法。

【請求項 41】

アオイ目 (Malvales) の有機抽出物がアオイ科 (Malvaceae) およびアオギリ科 (Sterculiaceae) から選択される請求項3に記載の方法。

【請求項 42】

アオイ科 (Malvaceae) の有機抽出物がアブチロン属 (Abutilon) からのものである請求項41に記載の方法。

【請求項 43】

アオギリ科 (Sterculiaceae) の有機抽出物がピンポンノキ属 (Sterculia) からのものである請求項41に記載の方法。

【請求項 44】

Musales 目の有機抽出物がクスウコン科 (Marantaceae) およびバショウ科 (Musaceae) からな

10

20

30

40

50

る植物の科から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項45】

クズウコン科(Marantaceae)の有機抽出物がマランタ属(Maranta)からのものである請求項44に記載の方法。

【請求項46】

バショウ科(Musaceae)の有機抽出物がバショウ属(Musa)からのものである請求項44に記載の方法。

【請求項47】

フトモモ目(Myrtales)の有機抽出物がBalanphoaceae科およびアカバナ科(Onagraceae)からなる植物の科から選択されるものである請求項3に記載の方法。

10

【請求項48】

Balanphoaceae科の有機抽出物がイリシウム属(Cynomorium)からのものである請求項47に記載の方法。

【請求項49】

アカバナ科(Onagraceae)の有機抽出物がマツヨイグサ属(Oenothera)からのものである請求項47に記載の方法。

【請求項50】

ケシ目(Papaverales)の有機抽出物がフウチョウソウ科(Capparidaceae)およびケシ科(Papaveraceae)からなる植物の科から選択されるものである請求項3に記載の方法。

20

【請求項51】

フウチョウソウ科(Capparidaceae)の有機抽出物がフウチョウボク属(Capparis)からのものである請求項50に記載の方法。

【請求項52】

ケシ科(Papaveraceae)の有機抽出物がケシ属(Papaver)からのものである請求項50に記載の方法。

【請求項53】

オオバコ目(Plantaginales)の有機抽出物がオオバコ科(Plantaginaceae)から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項54】

オオバコ科(Plantaginaceae)の有機抽出物がオオバコ属(Plantago)からのものである請求項53に記載の方法。

30

【請求項55】

ナス目(Polemoniales)の有機抽出物がムラサキ科(Boraginaceae)、ヒルガオ科(Convolvulaceae)、およびナス科(Solanaceae)からなる植物の科から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項56】

ムラサキ科(Boraginaceae)の有機抽出物がコーディア属(Cordia)からのものである請求項55に記載の方法。

【請求項57】

ヒルガオ科(Convolvulaceae)の有機抽出物がイポメア属(Ipomoea)からのものである請求項55に記載の方法。

40

【請求項58】

ナス科(Solanaceae)の有機抽出物がトウガラシ属(Capsicum)およびナス属(Solanum)からなる属から選択されるものである請求項55に記載の方法。

【請求項59】

キンボウゲ目(Ranales)の有機抽出物がツツラフジ科(Menispermaceae)から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項60】

ツツラフジ科(Menispermaceae)の有機抽出物がミヤコジマツツラフジ属(Cissampelos)からのものである請求項59に記載の方法。

50

【請求項 6 1】

バラ目 (Rosales) の有機抽出物がマメ科 (Fabaceae) から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 6 2】

マメ科 (Fabaceae) の有機抽出物がアカシア属 (Acacia)、ネムノキ属 (Albizzia)、ダイズ属 (Glycine)、インゲン属 (Phaseolus)、トリゴネラ属 (Trigonella)、およびササゲ属 (Vigna) からなる属から選択されるものである請求項61に記載の方法。

【請求項 6 3】

アカネ目 (Rubiaceae) の有機抽出物がアカネ科 (Rubiaceae) およびオミナエシ科 (Valerianaceae) からなる植物の科から選択されるものである請求項3に記載の方法。

10

【請求項 6 4】

アカネ科 (Rubiaceae) の有機抽出物がクルマバソウ属 (Asperula) からのものである請求項63に記載の方法。

【請求項 6 5】

オミナエシ科 (Valerianaceae) の有機抽出物がカノコソウ属 (Valeriana) からのものである請求項63に記載の方法。

【請求項 6 6】

ミカン目 (Rutales) の有機抽出物がミカン科 (Rutaceae) から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 6 7】

ミカン科 (Rutaceae) の有機抽出物がミカン属 (Citrus) からのものである請求項66に記載の方法。

20

【請求項 6 8】

ゴマノハグサ目 (Scrophulariales) の有機抽出物がキツネノマゴ科 (Acanthaceae) から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 6 9】

キツネノマゴ科 (Acanthaceae) の有機抽出物がハアザミ属 (Acanthus) からのものである請求項68に記載の方法。

【請求項 7 0】

セリ目 (Umbellales) の有機抽出物がセリ科 (Apiaceae) から選択されるものである請求項3に記載の方法。

30

【請求項 7 1】

セリ科 (Apiaceae) の有機抽出物がシシウド属 (Angelica)、カルム属 (Carum)、ツボクサ属 (Centella)、エリンギウム属 (Eryngium)、およびカワラボウフウ属 (Peucedanum) からなる属から選択されるものである請求項70に記載の方法。

【請求項 7 2】

イラクサ目 (Urticales) の有機抽出物がクワ科 (Moraceae) およびニレ科 (Ulmaceae) からなる植物の科から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 7 3】

クワ科 (Moraceae) の有機抽出物がクワ属 (Morus) からのものである請求項72に記載の方法。

40

【請求項 7 4】

ニレ科 (Ulmaceae) の有機抽出物がニレ属 (Ulmus) からのものである請求項72に記載の方法。

【請求項 7 5】

スミレ目 (Vioales) の有機抽出物がイイギリ科 (Flacourtiaceae) およびトケイソウ科 (Passifloraceae) から選択されるものである請求項3に記載の方法。

【請求項 7 6】

イイギリ科 (Flacourtiaceae) の有機抽出物がパンギウム属 (Pangium) からのものである請求項75に記載の方法。

50

【請求項 77】

トケイソウ科 (Passifloraceae) の有機抽出物がトケイソウ属 (Passiflora) からのものである請求項75に記載の方法。

【請求項 78】

有機抽出物が以下を含む方法により得られる精製組成物である請求項1に記載の方法：(a) 植物を有機溶媒と接触させて該植物から抽出物を抽出すること[該抽出物はCOX-2活性を阻害する]；そして

(b) COX-2阻害活性を有する該抽出物を分離すること。

【請求項 79】

抽出物がCOX-2活性を選択的に阻害する請求項78に記載の方法。

10

【請求項 80】

ステップ(a)がさらに以下を含む請求項78に記載の方法：

植物を有機溶媒と混合し、そして得られた混合物を、25 と前記溶媒の沸点の間の温度で少なくとも1分間攪拌すること。

【請求項 81】

炭化水素溶媒、エーテル類、塩素化溶媒、アセトン、酢酸エチル、ブタノール、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコールおよびそれらの混合物からなるグループから有機溶媒を選択する請求項78に記載の方法。

【請求項 82】

有機溶媒が非極性である請求項81に記載の方法。

20

【請求項 83】

非極性有機溶媒がジクロロメタンまたはヘキサンである請求項82に記載の方法。

【請求項 84】

ステップ(b)が以下をさらに含む請求項78に記載の方法：

溶媒をエバポレーターで除くことにより有機抽出物から溶媒を分離すること。

【請求項 85】

生物においてCOX-2に仲介される炎症あるいは炎症性疾患の治療法または予防法であって、請求項78に記載の治療的あるいは予防的有効量の精製組成物を含む組成物を生物に投与することを含む方法。

【請求項 86】

炎症性疾患が関節炎である請求項85に記載の方法。

30

【請求項 87】

炎症性疾患が疼痛である請求項85に記載の方法。

【請求項 88】

炎症性疾患が発熱である請求項85に記載の方法。

【請求項 89】

癌の治療または予防における使用のための請求項85に記載の方法。

【請求項 90】

癌が上皮細胞癌である請求項89に記載の方法。

【請求項 91】

上皮細胞癌が結腸癌、乳癌、前立腺癌、膀胱癌または肺癌である請求項90に記載の方法。

40

【請求項 92】

中枢神経系疾患の治療または予防における使用のための請求項85に記載の方法。

【請求項 93】

中枢神経系疾患がアルツハイマー病である請求項92に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)を阻害する能力を有する非ステロイド性抗炎症剤である栄養補助食品に関する。本発明は、食用植物から分離したCOX-2

50

阻害活性を有する有機抽出物を生物に投与することによる、生物におけるCOX-2阻害法あるいはCOX-2選択的阻害法に関する。本発明はまた、食用植物有機抽出物の精製組成物に関する。さらに本発明は、生物におけるCOX-2炎症あるいは炎症性疾患の治療法および/または予防法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

プロスタグランジンは、炎症反応において重要な役割を果たす生物活性脂質誘導体の強力な種類である。炎症反応は、疼痛、熱、赤みおよび腫れを特徴とする損傷または他の外傷に対する局所組織反応である。プロスタグランジンはこの反応を、血小板凝集阻害、血管透過性亢進、血管拡張、平滑筋収縮の誘起および好中球走化性の誘起により調節する。炎症反応の調節において中心的な役割を果たしているため、プロスタグランジンの生合成を阻害する能力を有する組成物の解明にむけて多くの努力がなされてきた。

10

【0003】

この目的のために、プロスタグランジンの生合成は広範に解明されてきた。プロスタグランジンは、一般的にアラキドン酸より誘導される酸化脂肪酸のグループである。アラキドン酸からのプロスタグランジンの生合成は以下の3段階工程によって行なわれる 1) ホスホリパーゼA₂によって触媒されるリン脂質前駆体からのアラキドン酸の加水分解; 2) シクロオキシゲナーゼ("COX")によって触媒されるアラキドン酸のプロスタグランジンG₂("PGG₂")への酸化(このCOX触媒反応がプロスタグランジン合成における最初でかつ律速段階の反応である); そして3) 一連のシンターゼおよびレダクターゼによって触媒されるプロスタグランジンG₂からの生物活性最終生成物であるプロスタグランジンへの変換(この合成の後、プロスタグランジンは細胞を出てGタンパク質連結膜受容体を介して標的細胞に影響することによりホルモン様作用を発揮する)。

20

【0004】

COX酵素の不活性化は、プロスタグランジン生合成経路におけるこの酵素の重要な役割に基づくプロスタグランジン産生を阻害する手段としての天然の標的である。現在では、COX-1およびCOX-2と呼ばれるCOX酵素活性を有する2つの遺伝子産物が発現されていることが知られている。COX-1は、最初に発見されたアイソフォームであり、ほとんどの組織型で構成的に発現されている。構成的に発現されているため、COX-1は速い生理的応答を必要とする活性に関与することができ、"ハウスキーピング"機能に関連するプロスタグランジン産生を引き起こす。例えば、COX-1は、血管恒常性を調節し、消化管統合性を維持し、腎機能を維持する急性のプロスタグランジン産生を引き起こす。このように、COX-1活性は様々な細胞型の維持に必要なプロスタグランジン合成を担っている。

30

【0005】

これに引き換え、COX-2は、細菌リポ多糖、増殖因子、サイトカイン、およびホルモルエステルなどの多くの刺激に応答して誘導的に発現される最近発見されたアイソフォームである。さらに、COX-2は、単球、マクロファージ、好中球、線維芽細胞および内皮細胞を含む、限られた数の細胞型においてのみ発現される。COX-2の発現は、COX-1の発現とは異なり、リウマチ滑膜組織において増加することが示されている。これとは対照的に、COX-2発現はグルココルチコイドへの応答および抗炎症性サイトカインにより阻害される。従って、これらの観察に基づき、COX-2は炎症反応および炎症関連疾患に関与するプロスタグランジン産生の調節を担うアイソフォームであることが示されている。さらに、COX-2は特定の癌、アルツハイマー病、アテローム性硬化症、ならびに、脳卒中、虚血および外傷によって起こる中枢神経系損傷に関与することが示されている。

40

【0006】

コルチコステロイドは、炎症反応の影響を軽減するための一つの手段を提供する。この強力な抗炎症剤は、種々のメカニズムにより免疫系細胞の数と活性の減少を引き起こすことにより効果を発揮する。しかしながらコルチコステロイドの長期投与は激しい副作用をも

50

たらし、このことがこの種類の抗炎症剤の治療的価値を制限している。

【0007】

非ステロイド性抗炎症剤(NSAID)もまた炎症反応の影響を軽減する手段として用いられている。NSAIDの主な医薬効果は、COX活性を阻害することによりプロスタグランジン合成を阻害することができることに起因する。NSAIDによるプロスタグランジン合成阻害により、解熱作用、鎮痛作用、抗炎症作用、抗血栓作用がもたらされる。しかしながら、NSAIDの投与はまた、消化管出血、潰瘍および腎障害の悪化などの重篤な副作用の原因となる。NSAIDはまたCOXアイソフォームを様々な程度に阻害する。例えば、最もよく知られたNSAIDであるアスピリン(サリチル酸のアセチル化誘導体)は、アラキドン酸結合ドメインに位置するセリン残基をアセチル化することによりCOX-1およびCOX-2の両方を不可逆的に不活性化することによりプロスタグランジン合成を阻害する。アスピリンは両方のアイソフォームを阻害するが、COX-2に比べてCOX-1を10-100倍効果的に不活性化する。

10

【0008】

COX-2の選択的阻害により、胃および腎臓に関連した毒性問題を伴うことなく抗炎症作用および鎮痛作用が発揮されることが明らかにされている。この現象は、COX-1(消化管統合性および腎機能の両方を維持するプロスタグランジン産生を担っている)を阻害することなくCOX-2(炎症反応を調節するプロスタグランジン産生を担っている)を阻害することができるNSAIDの発見により明らかとなった。従って、COX-2選択的阻害剤の開発により、NSAIDの有益な効果をその激しい副作用から分離することが可能となる。

20

【0009】

その目的のためにプロスタグランジン合成のCOX-2選択的阻害剤であるいくつかの薬剤が開発されてきた。最も広範に解明の進んだCOX-2選択的阻害剤の種類は、最近承認された薬剤であるセレコキシブおよびロフェコキシブを含むジアリールヘテロ環類である。しかしながら、他の種類にも、酸性スルホンアミド類、インドメタシン類似体、ゾメピラック類似体、およびジ-t-ブチルフェノール類が含まれるがこれに限定されない。例えば、米国特許第5,380,738号はCOX-2を選択的に阻害するオキサゾール類を記載し、米国特許第5,344,991号はCOX-2を選択的に阻害するシクロペンテン類を記載し、米国特許第5,393,790号はCOX-2を選択的に阻害するスピロ化合物を記載し、WO94/15932はCOX-2を選択的に阻害するチオフェンおよびフラン誘導体を記載し、そしてWO95/15316はCOX-2を選択的に阻害するピラゾリルスルホンアミド誘導体を記載している。

30

【0010】

選択的COX-2阻害薬物療法の代替手段を提供するためには、COX-2を阻害する栄養補助食品を提供すること、あるいはさらに好ましくは、COX-2を選択的に阻害する栄養補助食品を提供することは、大変に有益であると思われる。ここでは、栄養補助食品はCOX-2阻害活性を有する食品あるいはその抽出物を指す。特に、このような植物起源の食品あるいは抽出物を得ることは、比較的安い費用で植物からの多量の食品または抽出物を得ることができるため、大変に有益である。これらの栄養補助剤は、"健康な"生理状態を維持するために、食餌療法において予防的に使用することができる。これらの栄養補助剤はまた、既存の炎症関連疾患の処置、治療あるいは緩和の手段として、単独で、あるいは併用療法の一部として他の化合物と共に用いることができる。

40

【発明の開示】

【0011】

発明の概要

従って数ある側面の中で、本発明はとりわけ生物におけるCOX-2活性の選択的阻害法を提供し、該方法が治療的あるいは予防的有効量の食用植物有機抽出物を生物に投与するステップを含む方法であり、ここで抽出物のCOX-2活性阻害効果が、抽出物のCOX-1阻害効果の約2倍以上である方法を提供する。

【0012】

50

本発明のもう一つの側面は、生物におけるCOX-2活性阻害法であり、該方法が治療的あるいは予防的有効量の食用植物有機抽出物を生物に投与するステップを含む方法であり、ここで該植物が、Agavales、リンドウ目(Apocynales)、サトイモ目(Arales)、ウマノスズクサ目(Aristolochiales)、キク目(Asterales)、フウチョウソウ目(Brassicales)、サボテン目(Cactales)、ナデシコ目(Caryophyllales)、ウリ目(Cucurbitales)、Elaeagnales、ブナ目(Fagales)、グネツム目(Gnetales)、イネ目(Graminales)、シソ目(Lamiales)、ユリ目(Liliales)、アオイ目(Malvales)、Musales、フトモモ目(Myrtales)、ケシ目(Papaverales)、オオバコ目(Plantaginales)、ナス目(Polemoniales)、キンポウゲ目(Ranales)、バラ目(Rosales)、アカネ目(Rubiales)、ミカン目(Rutales)、ゴマノハグサ目(Scrophulariales)、セリ目(Umbellales)、イラクサ目(Urticales)、およびスミレ目(Violales)からなる目から選択される方法を提供する。

10

【0013】

本発明は、さらにまた、生物におけるCOX-2の選択的阻害法を提供し、該方法が生物に治療的あるいは予防的有効量の食用植物の有機抽出物を投与するステップを含む方法であり、ここで抽出物のCOX-2活性阻害効果が抽出物のCOX-1活性阻害効果の約2倍以上であり、ここで有機抽出物が、抽出物がCOX-2活性を阻害する植物から抽出物を取り出すために有機溶媒を植物と接触させ、次いでCOX-2阻害活性を有する抽出物を分離することを含む方法により得られる精製組成物である方法を提供する。

【0014】

さらにもう一つの側面は生物においてCOX-2炎症または炎症性疾患を治療または予防する方法を提供し、該方法が治療的あるいは予防的有効量の食用植物から分離した有機抽出物の精製組成物を生物に投与するステップを含む方法であり、ここで、抽出物がCOX-2活性を阻害する植物から抽出物を取り出すために植物を有機溶媒と接触させ、次いでCOX-2阻害活性を有する抽出物を分離することを含む方法により該精製組成物が得られる方法を提供する。

20

【0015】

本発明の他の特徴は、一部分は当業者に明らかであり、一部分は以下に記載する発明の詳細な説明において指摘する。

【0016】

略語および定義

30

本発明の理解を容易にするために、本明細書に用いるいくつかの用語および略語を以下に定義する。

【0017】

"精製された"は部分精製されたおよび/または完全精製されたことを意味する。従って、"精製組成物"は、部分精製されたあるいは完全精製されたもののいずれかを意味する。

"抽出物"は粗抽出物、精製抽出物、および抽出物の精製により得られた精製組成物を意味する。

【0018】

"COX活性"はアラキドン酸からPGG₂への酸化反応を触媒する、COX-1またはCOX-2のいずれかのCOXアイソフォームの能力を意味する。

40

"COX阻害剤あるいはCOX阻害"は、COX-1またはCOX-2のいずれかのCOXアイソフォームがアラキドン酸からPGG₂への酸化反応を全部あるいは部分的のいずれかに触媒することを阻害する、精製されたあるいは未精製の組成物、化合物、薬剤または抽出物を意味する。

【0019】

"選択的COX-2阻害"は、本明細書に特記しない限り、COX-2阻害率をCOX-1阻害率で割った比により測定される、COX-1活性以上にCOX-2活性を選択的に阻害する、精製されたあるいは未精製の組成物、化合物、薬剤、あるいは抽出物を意味する。

【0020】

"IC₅₀"は、特定の反応を元の値の50%に抑える濃度(モルL⁻¹)を意味する。本明細書で

50

用いる時、この値はPGE2産生を50%阻害する組成物、薬剤あるいは抽出物の量(μg 抽出物/ mL 溶媒)を意味する。本明細書に具体的に述べる様に、 IC_{50} 値はCOX-2選択性を測定することに用いることができる。

【0021】

"植物あるいはその器官"は、全植物、あるいは地上部、果実、葉、茎または根などの植物の任意器官およびそれらの任意の組み合わせのいずれかを意味する。

"目"は、本明細書で用いるとき、いくつかの類似の科からなるカテゴリーに属する関連生物の分類カテゴリーである。

【0022】

"科"は、本明細書で用いるとき、目より下のそして属より上の階級に属する関連生物の分類カテゴリーである。 10

"種"は、本明細書で用いるとき、属より下の階級に属しそして近縁の個体のグループからなる基本の分類カテゴリーである。

COX = シクロオキシゲナーゼ酵素

COX-1 = シクロオキシゲナーゼ-1アイソフォーム

COX-2 = シクロオキシゲナーゼ-2アイソフォーム

NSAID = 非ステロイド性抗炎症剤

PGE2 = プロスタグランジンE2

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

好ましい態様の説明

本出願人は、特定の食用植物あるいはその器官の有機抽出物がCOX-2活性を阻害することを見出した。本出願人はまた、特定の食用植物あるいはその器官の有機抽出物がCOX-2活性を選択的に阻害することを見出した。COX-1の阻害よりもCOX-2の阻害のほうが強力であるため阻害作用は選択的である。従って、かかる食用植物あるいはその器官の有機抽出物は、生物において、COX-1活性を等しく阻害することなくCOX-2活性を選択的に阻害することに用いることができる。幸便なことに、これらの有機抽出物は栄養補助食品であり、安全に摂取することができ、COX-2阻害のための従来の薬物療法の代替療法を提供できる。

【0024】

従って、本発明の抽出物は、COX-1活性より以上にCOX-2活性を好ましく阻害する。好ましくは、植物抽出物のCOX-2阻害作用はCOX-1阻害作用の少なくとも2倍以上である。さらに好ましくは、COX-2阻害作用はCOX-1阻害作用の少なくとも10倍以上である。COX酵素阻害作用および選択性は、以下にさらに詳細に述べる様に、当業者に公知の任意の方法に基づき測定することができる。

【0025】

COX-2阻害に加えて、本発明の有機抽出物は食用植物から好ましく分離することができる。本明細書で用いるとき、"食用"という用語は、生物体において成長、修復および生命過程を維持しエネルギーを供給するために用いられるタンパク質、炭水化物(線維または非線維)、脂肪および/またはその組み合わせからなる栄養物の目的で消費する物質を一般的に意味する。この一般的な定義に付け加えて、植物の食用対非食用の分類はまた以下の三つの主要な基準に基づく：(1) 食品としての使用の頻度；(2) 一般の商取引での利用可能性；(3) 効能に基づく毒性の限界。従って、食用植物は、合法的な商取引で何らかの形で植物が提供される地域において、消費者が好ましく入手することができる。さらに、好ましくは、食用植物の栄養物目的での使用が見られる土地固有の文化で通常用いられる量において日常的に安全に摂取できると考えられる使用の歴史を、食用植物は有する。例えば、疾患の症状を治す目的で(栄養物としてではなく)特定の植物を経口で摂取する場合、そしてそれが日常的に摂取するには強力すぎると考えられる場合、その植物は食用ではなく薬用と考えられる。食用植物の使用例は以下を含むが、これに限定されない：デンプン源、果実、野菜、香辛料、薬味、植物性食用油、食品着色剤および他の食品添加剤、 40 50

飲料、茶および炭酸水、砂糖および他の天然甘味料、醗酵飲料、醗酵体および酵素、非麻薬性の嚙む葉およびチューイングガム、木製香味食材、ならびに健康を維持し、成長を維持し、障害を修復し、そして一般的な健康を促進するために食べたり飲んだりする全ての他の天然物質。さらに、当業者により食用と分類されているいずれの植物も本発明の範囲に含まれ、例えば、このような参考文献は以下を含む： NAPRALERT；Tyozaburo Tanaka, (Sasuke Nakao監修) Tanaka's Cyclopedia of Edible Plants of the World, Keigaku Publishing Co. 日本、東京(1976年)；Stephen Facciola, Cornucopia IT : A Source Book of Edible Plants, Kampong Publications, カリフォルニア州ビスタ (1998年)；James A. Duke, Database of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants, CRC Press, フロリダ州ボークラトーン (1992年)；そして、George Macdonald Hocking, Dictionary of Natural Products, Plexus Publishing, Inc., ニュージャージー州メドフォード(1997年)。これらの参考文献の全体を本願に参照として包含する。

10

20

30

40

50

【0026】

特に好ましい実施態様において、有機抽出物は以下の植物目の食用植物から分離される：Agavales、リンドウ目(Apocynales)、サトイモ目(Arales)、ウマノスズクサ目(Aristolochiales)、キク目(Asterales)、フウチョウソウ目(Brassicales)、サボテン目(Cactales)、ナデシコ目(Caryophyllales)、ウリ目(Cucurbitales)、Elaeagnales、ブナ目(Fagales)、グネツム目(Gnetales)、イネ目(Graminales)、シソ目(Lamiales)、ユリ目(Liliales)、アオイ目(Malvales)、Musales、フトモモ目(Myrtales)、ケシ目(Papaverales)、オオバコ目(Plantaginales)、ナス目(Polemoniales)、キンポウゲ目(Ranales)、バラ目(Rosales)、アカネ目(Rubiales)、ミカン目(Rutales)、ゴマノハグサ目(Scrophulariales)、セリ目(Umbellales)、イラクサ目(Urticales)、およびスミレ目(Violales)。これらの特定の目の食用植物から分離される抽出物のCOX-2の阻害力、COX-2の選択的阻害力、およびその食用植物としての用途を、以下に示す表1-24および図1-22に記載する。

【0027】

抽出物がCOX-2阻害活性を阻害し、そして好ましくはこの抽出物のCOX-2阻害作用がCOX-1の阻害作用の2倍以上である食用植物から分離した任意の有機抽出物の使用を出願人がその発明の範囲と考えるとき、そしてまたこのような種類あるいは複数の種類の使用が出願人の考慮に含まれる場合、既に開示され使用されそしてこのような望ましい活性を生得的にあるいはそうでなく有する任意の特定のメンバー(例えば、種、属あるいは目)を除くことが理解されなければならない。例えば、出願人の本発明は、米国出願出願番号第09/272,363号に記載のAtractylodes lanceaに関連する発明の全範囲を必要に応じて含みあるいは除くことができ、この出願の全部を本願に引用して援用する。

【0028】

本発明の有機抽出物を製造するために、好ましくは食用植物あるいはその器官を微粉末にひき、得られた粉末を溶媒で抽出し、そして抽出物から抽出溶媒を除く。植物全体を用いることもできるし、あるいは地上部、果実、葉、茎または根およびそれらの任意の組み合わせを含む植物器官を用いることもできる。所望であれば、得られた抽出物をさらに精製して、精製抽出物あるいは1以上の精製組成物を得ることもできる。粉末化ステップは、植物材料を粉末化するための任意の慣用法により達成することができる。例えば、植物あるいはその器官は、グラインダーを通過させて微細粉末とすることができる。

【0029】

植物あるいはその器官を微細粉末にひいた後、それらを抽出溶媒と混合する。次いでその溶液を所望のCOX-2活性阻害作用を得るために効果のある温度と時間で攪拌する。この溶液は、加熱しすぎると抽出物中の化合物を分解および/または変性させる恐れがあるため、加熱しすぎないのが好ましい。溶液は室温(25℃)付近から抽出溶媒の沸点の間の温度で攪拌することができる。好ましくは、溶液は室温付近で攪拌する。

【0030】

植物粉末を抽出溶媒にさらす時間の長さは重要ではない。ある点までは、植物粉末を抽出

溶媒にさらす時間が長いほど回収される抽出物の量は多くなる。好ましくは、少なくとも1分間、さらに好ましくは少なくとも15分間、そして最も好ましくは少なくとも60分間攪拌する。

【0031】

本発明の抽出法は、好ましくは有機溶媒あるいは有機溶媒の混合物を用いて行なう。本発明の抽出法に用いることのできる有機溶媒は、炭化水素溶媒、エーテル溶媒、塩素化溶媒、アセトン、酢酸エチル、ブタノール、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコールおよびその混合物を含むがこれに限定されない。本発明に使用できる炭化水素溶媒は、ヘプタン、ヘキサンおよびペンタンを含む。本発明に使用できるエーテル溶媒は、ジエチルエーテルを含む。本発明に使用できる塩素化溶媒は、ジクロロメタンおよびクロロホルムを含む。好ましくは、かかる抽出に用いる溶媒はジクロロメタンまたはヘキサンなどの非極性有機溶媒である。

10

【0032】

本抽出法に用いる溶媒の相対量は、用いる特定の溶媒によって、かなり変化させることができる。一般的に、抽出する植物粉末各100gに対して、約500mlの抽出溶媒を用いる。抽出物からの有機溶媒は、例えばロータリーエバポレーターを用いるなどの化学界に公知の所望の生成物から有機溶媒を除去する任意の方法を用いて有機溶媒を除去することができる。

【0033】

本発明の植物抽出物のCOX-2活性阻害作用は、抽出物中の1以上の化合物の存在に起因すると考えられる。抽出物中に存在し、COX-2を阻害する化合物は、当業界に公知の慣用法を用いて分離し精製することができる。例えば、本発明の植物抽出物から純粋化合物を得るためにカラムクロマトグラフィーおよび分別蒸留を用いることができる。

20

【0034】

本発明の有機植物抽出物からの特定の化合物の分離および精製は、Resch, et al., J. Nat. Prod., 61, 347-350 (1998)に記載の方法で行なうことができ、その全部を本明細書に参照として包含する。この参考文献に開示されている方法は、COX-2を阻害する組成物の分離および精製に使用できる。

【0035】

特定の有機化合物のCOX-1またはCOX-2阻害能力は、好ましくは、組換えCOX-1およびCOX-2を用いるCOX活性アッセイを行なうことにより測定される。COX-1およびCOX-2遺伝子は、種々の生物からサブクローニングすることができるが、好ましい実施態様において、例えば、当業者に公知の種々の方法および Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (第二版), Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) および Ausabel et al., Short Protocols in Molecular Biology, (第三版), John Wiley & Sons (1995). に記載の方法を用いて、ヒトまたはマウスの供給源からかかる遺伝子が分離される。さらに、特定のCOX遺伝子のサブクローニング部分を種々の方法を用いてベクターに挿入することができる。好ましい方法において、当業者に公知の方法および例えば Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (第二版), Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) および Ausabel et al., Short Protocols in Molecular Biology, (第三版), John Wiley & Sons (1995). に記載の方法を用いてバキュロウイルストランスファベクターpVL1393の適切な制限エンドヌクレアーゼ器官に該配列を挿入することができる。

30

40

【0036】

組換えバキュロウイルスは、線状化バキュロウイルスプラスミドDNAを用いて、リン酸カルシウム法あるいは当業者に公知の他の任意の方法により、十分な量のSF9昆虫細胞に適当量のバキュロウイルストランスファベクターDNAをトランスフェクトすることにより分離することができる(M. D. Summers and G. E. Smith, A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agric. Exp. Station Bull. 1555 (1987)を参照のこと)。組換えウイルスは、3回のブランク精製により精

50

製することができ、高力価(10^7 - 10^8 pfu/ml)のウイルスストックを調整できる。

【0037】

好ましくは、大量生産のために、約10リットルのファーマンター(0.5×10^6 /ml)において感染多重度を約0.1以上の条件で組換えウイルスストックを用いて細胞をインフェクトすることができる。数時間後、該細胞を遠心分離し、細胞ペレットをトリス/ショ糖(50mM/25%、pH8.0)などの適切な緩衝液中でホモジェナイズする。次いで、このホモジネートを適切な速度および適切な時間(例えば10,000XGで30分間)で遠心分離し、ホモジネートをペレットおよび上澄み分画に分ける。得られた上澄み分画は所望の生成物を含み、使用するまで-80℃で保存することができる。

【0038】

有機抽出物のCOX-2阻害および選択性を試験するために、当業者に公知のELISA法を用いる標準的なCOX-1およびCOX-2アッセイを用いることができる。かかる試験法において、アラキドン酸から合成されたPGE₂量を検出するELISAを用いて、生成PGE₂/μgタンパク質/時間としてCOX-1およびCOX-2活性を検定する。PGE₂生成は、PGE₂特異抗体を用いて測定することができる。非特異的COX-2/COX-1阻害剤であるインドメタシンを陽性対照として用いることができる。特定の濃度における種々の有機抽出物のCOX-1あるいはCOX-2の相対阻害力を、PGE₂生成の50%阻害をもたらすμg抽出物/ml溶媒として表すIC₅₀値を比較することにより測定することができる。次いで、COX-2選択的阻害を、COX-1/COX-2のIC₅₀の比により測定することができる。さらに、当業者に公知のCOX阻害測定法であればいずれも用いることができる。

【0039】

本発明の抽出物は、COX-2により全体的にあるいは部分的に仲介される症状を有するあるいは発症する危険のある生物の管理、予防および/あるいは治療に用いることができる。従って、COX-2の阻害あるいはCOX-2の選択的阻害により利益を得る症状は、生物における炎症および他の炎症性疾患を含み、例えば疼痛および頭痛における鎮痛剤としてあるいは発熱の治療のための解熱剤として有用であるがこれに限定されない。例えば、本発明の抽出物は関節炎の治療に有用であり、リウマチ様関節炎、脊椎関節症、通風性関節炎、変形性関節症、全身性エリスマトーデス、および若年性関節炎を含むがこれに限定されない。かかる本発明の抽出物は、喘息、気管支炎、生理痛、腱炎、滑液包炎、皮膚関連症状(皮膚、乾癬、湿疹および皮膚炎など)ならびに白内障手術および屈折矯正手術などの眼手術を含む術後炎症の治療に有用である。本発明の抽出物はまた炎症性腸疾患、クローン病、胃炎、過敏性腸症候群および潰瘍性大腸炎などの消化器症状の治療に、ならびに結腸癌、乳癌、前立腺癌または肺癌などのタイプの癌を含む癌の治療にも有用であるがこれに限定されない。さらにもう一つの好ましい使用において、本発明の抽出物はまた、化学予防剤としても用いることができる。本発明の抽出物はまた、血管疾患、偏頭痛、結節性動脈周囲炎、甲状腺炎、再生不良性貧血、ホジキン病、強皮症、リュウマチ熱、I型糖尿病、重症筋無力症を含む神経筋接合部疾患、多発性硬化症を含む白質疾患、サルコイドーシス、ネフローゼ症候群、ベーチェット症候群、多発性筋炎、歯肉炎、腎炎、過敏症、損傷後に生じる腫れ、心筋虚血などの疾患における炎症の治療に有用である。本発明の抽出物はまた、網膜炎、網膜症、ブドウ膜炎、しゅう明、および眼組織への急性損傷などの眼疾患の治療に有用である。該抽出物はまた、ウイルス感染および嚢胞性線維症に伴う肺の炎症の治療に有用である。さらに、該抽出物は、アルツハイマー病を含む皮質痴呆などの中枢神経系疾患の治療に有用である。本発明の抽出物は、有害な副作用が大変に少ないというさらなる利点を有する、関節炎治療などのための抗炎症剤として有用である。これらの抽出物はまた、アレルギー性鼻炎、呼吸窮迫症候群、内毒素性ショック症候群、アテローム性硬化症、ならびに脳卒中、虚血および外傷に起因する中枢神経系損傷の治療に有用である。さらに該抽出物は、術後疼痛、歯痛、筋肉痛、および癌に起因する疼痛などの疼痛を含む治療に有用であるがこれに限定されない。

【0040】

本抽出物はまた、単独での、あるいは従来の抗炎症剤を部分的にあるいは完全に換えて用

10

20

30

40

50

いる併用療法の一部として他の化合物との併用での、いずれかで使用することができる。例えば、ステロイド、NSAID、5-リポキシゲナーゼ阻害剤、ロイコトリエン受容体アンタゴニスト、LT A 4ヒドロラーゼ阻害剤、およびLTC₄シンターゼ阻害剤などと併用することができる。好ましくは、併用療法において、典型的には、単数あるいは複数の薬剤と本発明の植物抽出物などの栄養補助食品とを、薬剤と栄養補助食品が同一の疾患を標的とするが異なる作用メカニズムを有する方法で併用する。例えば、関節炎治療のための併用療法に使用する薬剤の標準的な選択において、選択的COX-2阻害作用を有する本発明の植物抽出物を、独自のメカニズムで関節炎に伴う炎症を抑えることが知られている他の薬剤と共に用いることができる。

【0041】

医薬剤の製造業者は、公知の医薬品添加物(例えば生理食塩水、グルコース、デンプンなど)を用いて植物抽出物を有する医薬組成物を容易に製剤化することができる。同様に、栄養剤製造業者は、植物抽出物を含む栄養組成物を容易に製剤化することができる。そして、食品あるいは食品成分製剤業者は、植物抽出物を含む食品成分組成物を容易に製剤化することができる。

【0042】

さらに、当業者は、経口、非経口、経直腸および他の投与剤形において所望の治療あるいは予防効果を得るために必要な適切な投与量を容易に決定することができる。標準的には、*in vivo* モデル(即ち、実験哺乳動物)を、炎症性症状の緩和を所望な程度に得るために必要な適切な血漿濃度を決定するために使用する。

【0043】

前記で記載した炎症性疾患の治療および/または予防のために、本発明の抽出物を多くの生物において使用することができる。ヒトの治療に有用なことに加えて、これらの抽出物はまた、哺乳動物、げっ歯動物、鳥類などを含むペット動物、外来動物、および農園動物の獣医治療に有用である。さらに好ましい動物は、ウマ、イヌ、ネコ、ヒツジ、およびブタを含む。

【0044】

前記で述べた詳細な説明は、本発明を実施する当業者を支援するために提供するものである。しかしながら、この詳細な説明は、本発明に記載の実施例における修飾および変形が、本発明の発見の精神および範囲から外れることなく当業者に行なうことができるので、本発明を不当に制限するものであると解釈してはならない。

【0045】

本出願に引用した全ての出版物、特許、特許出願および他の引用文献は、各出版物、特許、特許出願および他の引用文献を具体的にかつ個別的に参照として援用するために示したと同様にその全体を本明細書に参照として援用する。

【0046】

さらに推敲せずとも、当業者は、前記の記載を用いて、本発明を完全に利用できると考えられる。従って、以下の好ましい具体的な実施例は単に説明として解釈されるべきで、たとえ形はどうであれ、本開示の残りの部分を限定するものと解釈してはならない。

【実施例】

【0047】

試料調製

植物またはその器官を乾燥し、薄切りにした("試料")。有機抽出物試料は表1に記載した食用植物より調整した。種々の試料を調整した植物の目および科もまた表1に示してある。さらに、これらの植物の食べ物としての用途に関する詳細は表2に示してある。次いで、コーヒングライNDERを用いて特定の試料を微細粉末にした。約100gの得られた粉末に約500m lのジクロロメタンを加え、室温で約1時間攪拌した。次いで、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除き、数グラムの特定の抽出物を得た。

【0048】

種々の植物有機抽出物のCOX-1およびCOX-2活性阻害作用

10

20

30

40

50

前記の試料調整法により得られた特定の抽出物のそれぞれのCOX-1およびCOX-2選択的阻害作用を評価した。COX-1およびCOX-2阻害活性をin vitroでGierse et al., J. Biochem., 305,479-484 (1995)の方法に従って測定した。この方法を以下に要約する。

【0049】

組換えCOXバキュロウイルスの作製

D. R. O'Reilly et al., Baculoviruses Expression Vectors: A Laboratory Manual (1992)の方法に従って、ヒトまたはマウスのCOX-1コード領域を有する2,0kbの断片を、バキュロウイルストランスファクターpVL1393 (Invitrogen)のBamH1器官にクローニングしてCOX-1のバキュロウイルストランスファクターを得ることにより組換えCOX-1バキュロウイルスを作製した。

10

【0050】

次いで、リン酸カルシウム法により、 (2×10^8) SF9 昆虫細胞に、200 μ gの線状化バキュロウイルスプラスミドDNAと共に4 μ gのバキュロウイルストランスファクターDNAをトランスフェクトして組換えバキュロウイルスを分離した (M. D. Summers and G. E. Smith, A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agric. Exp. Station Bull. 1555 (1987)を参照のこと)。3回のブランク精製により組換えウイルスを精製し、高力価(10^7 - 10^8 pfu/ml)のウイルスストックを作製した。

【0051】

大量生産のために、10リットルファーマンター (0.5×10^6 /ml)中で、感染多重度0.1の条件でSF9昆虫細胞を組換えバキュロウイルスストックで感染させた。72時間後、細胞を遠心分離し得られた細胞ペレットを1%の3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホナート(CHAPS).を含有するトリス/ショ糖(50 mM/25%, pH 8.0)中でホモジナイズした。次いでホモジネートを10,000XGで30分間遠心分離し、得られた上澄みを使用するまで-80 で保存した。

20

【0052】

前述のCOX-1の場合と同一の方法に基づき、ヒトまたはマウスCOX-2のコード領域を含む2.0kbの断片をクローニングすることにより、組換えCOX-2を作製した。

【0053】

COX-1およびCOX-2活性アッセイ

アラキドン酸から合成されるPGE2を検出するELISAを用いて、生成プロスタグランジンE2(PGE2)/ μ gタンパク質/時間としてCOX-1およびCOX-2活性を検定した。組換えCOX-1またはCOX-2酵素を含むCHAPS可溶性昆虫細胞膜を、エピネフリン、フェノール、およびヘムを含有するリン酸カリウム緩衝液(50mM, pH8.0)中でインキュベートした。化合物を適切な酵素と共に約10-20分間プレインキュベートした。次いでこの混合物にアラキドン酸(10 μ M)を加え、室温で(25)10分間反応させた。

30

【0054】

10分後、40mlの反応混合物を160mlのELISA緩衝液および25Mのインドメタシンに加えアラキドン酸と酵素の間の全ての反応を停止した。非選択的COX-2/COX-1阻害剤であるインドメタシンを陽性対照として用いた。PGE2特異抗体(Cayman Chemical)を用いる標準的ELISA技術により、生成したPGE2を測定した。

40

【0055】

各抽出物のCOX-1およびCOX-2阻害作用を測定するバイオアッセイのために、前記の試料調整法により得た各抽出物の約200mgを、それぞれ2mlのジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した。PGE2産生の50%阻害をもたらすg抽出物/ml溶媒で表されるIC₅₀値により効力を測定した。COX-2の選択的阻害をCOX-1/COX-2のIC₅₀比により測定した。記載した植物群から分離した抽出物を用いて行なったこれらのバイオアッセイの結果を以下の表3-24および図1-22に示す。

【0056】

50

記載した目、科、属、および種から分離した食用植物抽出物のスクリーニング結果を以下の表1に示す。一次スクリーニング(表1において、1°アッセイとして表示)は、 $10\mu\text{g/ml}$ の濃度においてCOX-2を阻害する特定の抽出物を測定するために行なった。次いで、異なる3つの濃度($10\mu\text{g/ml}$ 、 $3.3\mu\text{g/ml}$ および $1.1\mu\text{g/ml}$)におけるCOX-2阻害強度を測定するために抽出物の確認スクリーニングを行なった。ついで $10\mu\text{g/ml}$ の濃度における抽出物のCOX-1阻害力を測定した。それぞれの縦の段に対照と比較したCOX阻害比率をパーセント表示で示すが、ここで、高い比率は高い程度のCOX阻害を示す。さらに、表1に記載するように、特定の抽出物のCOX-1およびCOX-2の IC_{50} 値を測定した。次に、前記のように、COX-1/COX-2の IC_{50} 比によりこれらの抽出物の選択性を決定した。 IC_{50} 値を測定しなかった抽出物のCOX-2選択性は、COX-2阻害パーセント($10\mu\text{g/ml}$ の濃度)をCOX-1阻害パーセント($10\mu\text{g/ml}$ の濃度)で割ることにより計算できる。

10

【 0 0 5 7 】

【 表 1 】

表 1 -COX-2を阻害する食用植物からの抽出物

目	科	属	種	英名	1 st アッセイ COX-2 (%阻害) 10 ug/ml	確認アッセイ COX-2 (%阻害) 10 ug/ml 3.3 ug/ml 1.1 ug/ml	COX-1 (%阻害) 10 ug/ml	IC50 (ug/ml) COX-2	IC50 (ug/ml) COX-1	選択性 COX-2/COX-1
Agavales	Agavaceae	Yucca	elephantipes	izote; Spanish dagger	88%	83%	46%	40%	0.7	14
Apocynales	Asclepiadaceae	Asclepias	tuberosa	pleurisy root	82%	93%	**	17%	***	***
Arales ¹	Araceae	Aconit	calamus root	calamus root	76%	78%	57%	64%	***	***
Arales ¹	Araceae	Aconit	gramineus	shih-chang	91%	84%	52%	29%	***	***
Arales ¹	Araceae	Colocasia	esculenta	malanga coco	77%	82%	46%	37%	***	***
Arales ¹	Araceae	Colocasia	esculenta	taro	76%	100%	**	30%	***	***
Arales ¹	Araceae	Xanthosoma	sagittifolium	malanga	87%	96%	**	31%	***	***
Arales ¹	Araceae	Xanthosoma	sagittifolium	malanga	76%	94%	**	27%	15	30
Aristocholales	Aristolochiaceae	Aristolochia	unidentified	radix aristolochiae	78%	89%	67%	49%	***	***
Aristocholales	Aristolochiaceae	Aristolochia	unidentified	tarragon	75%	73%	54%	61%	***	***
Asterales	Asteraceae	Artemisia	dracuncul	Radix asteris	77%	100%	**	31%	1.5	22
Asterales	Asteraceae	Aster	unidentified	endive	79%	94%	**	36%	0.8	7.5
Asterales	Asteraceae	Blumea	alata	endive	80%	69%	39%	39%	***	***
Asterales	Asteraceae	Cichorium	endivia	endive	81%	100%	**	32%	3.5	35
Asterales	Asteraceae	Cirsiocephalum	mammii	milk thistle	90%	100%	**	35%	***	***
Asterales	Asteraceae	Silybum	marianum	chicory	85%	82%	75%	62%	***	***
Asterales	Asteraceae	Senecio	oleraceus	mansen-tanpopo	83%	83%	**	28%	***	***
Asterales	Asteraceae	Taraxacum	mongolicum	dandelion	75%	100%	**	26%	***	***
Asterales	Asteraceae	Taraxacum	officinale	turnip; choy sun	75%	86%	**	19%	***	***
Brassicales	Brassicaceae ²	Brassica	rapa	shepherd's purse	81%	86%	**	29%	***	***
Brassicales	Brassicaceae ²	Brassica	bursa-pastoris	turnip	86%	100%	**	30%	***	***
Brassicales ¹	Brassicaceae ²	Brassica	rapa	pitahaya	95%	85%	65%	39%	***	***
Cactales	Cactaceae	Hyloteris	undatus	burweed	76%	91%	65%	45%	***	***
Caryophyllales	Amaranthaceae	Alternanthera	pungens	chickweed	86%	81%	**	24%	***	***
Caryophyllales	Caryophyllaceae	Stellaria	media	chickweed	80%	98%	**	21%	2	15
Caryophyllales	Caryophyllaceae	Stellaria	media	chickweed	83%	94%	65%	78%	4	20
Caryophyllales	Phytolaccaceae	Phytolacca	americana	pokeweed	80%	76%	58%	5%	***	***
Caryophyllales	Polygonaceae	Polygonum	aviculare	hama-tade	76%	81%	47%	28%	***	***
Caryophyllales	Polygonaceae	Polygonum	caspitatum	knorweed; smartweed	78%	85%	46%	33%	***	***
Caryophyllales	Polygonaceae	Polygonum	odoratum	Japanese dock	78%	79%	60%	22%	***	***
Caryophyllales	Polygonaceae	Polygonum	unidentified	watermelon	75%	76%	43%	55%	***	***
Caryophyllales	Polygonaceae	Rumex	japonicus	cucumber	81%	100%	**	51%	0.7	9
Cucurbitales	Cucurbitaceae	Citrullus	vulgaris	silver berry	87%	88%	89%	100%	***	***
Cucurbitales	Cucurbitaceae	Mukia	inaderaspata	ginkgo nuts	88%	78%	**	30%	***	***
Elaeagnales	Elaeagnaceae	Elaeagnus	umbellata	Job's tears	82%	86%	81%	56%	***	***
Fagales	Fagaceae	Castanea	sativa	sweet Indian millet	79%	85%	79%	53%	***	***
Gnetales	Ginkgoaceae	Ginkgo	biloba	barley	83%	100%	60%	29%	***	***
Graminales	Poaceae ³	Coix	lacrima-jobi		76%	81%	**	48%	2	35
Graminales	Poaceae ³	Elausine	coarctata		84%	100%	**	48%	***	***
Graminales	Poaceae ³	Hordeum	distichum		80%	100%	**	34%	***	***

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

【 表 2 】

表 1 - COX-2を阻害する食用植物からの抽出物

目	科	属	種	英名	器官	I*アッセイ COX-2 (%阻害) 10 ug/ml	確認アッセイ COX-2 (%阻害) 10 ug/ml 3.3 ug/ml 1.1 ug/ml	COX-1 (%阻害) 10 ug/ml	IC50 (ug/ml) COX-2	IC50 (ug/ml) COX-1	選択性 COX-2/COX-1
Graminales	Poaceae ¹	Oryza	sativa	rice	SD	78%	74% 54%	-20%	***	***	***
Graminales	Poaceae ¹	Oryza	sativa var. sticky sweet	sticky sweet rice	SD	75%	95% **	16%	***	***	***
Graminales	Poaceae ¹	Zea	mays	corn		82%	85% 69%	49%	***	***	***
Lamiales	Lamiaceae ⁴	Lycopus	lucidus	herba lycopi	PL	75%	95% **	15%	***	***	***
Lamiales	Lamiaceae ⁴	Ocimum	basilicum	herba ocimi	PX	75%	74% 40%	33%	***	***	***
Lamiales	Lamiaceae ⁴	Perilla	frutescens	folium perillae	LF	76%	82% 62%	31%	***	***	***
Lamiales	Lamiaceae ⁴	Prunella	vulgaris	spica prunellae	FL	78%	89% **	26%	***	***	***
Lamiales	Lamiaceae ⁴	Salvia	unidentifed	sage	RT	80%	94% **	44%	3.5	18	5
Lamiales	Verbenaceae	Vitex	agnus-castus	chaste lamb		82%	78% 47%	40%	1.5	50	33
Liliales	Dioscoreaceae	Dioscorea	minutiflora	bush yam		79%	95% **	17%	1.5	18	12
Liliales	Dioscoreaceae	Dioscorea	unidentified	yam	RT	77%	59% 36%	-7%	***	***	***
Liliales	Liliaceae	Allium	schoenoprasum	Chinese chives		90%	96% 79%	46%	***	***	***
Liliales	Liliaceae	Allium	unidentified		FR	77%	84% **	20%	***	***	***
Liliales	Liliaceae	Lilium	unidentified	lily flower	FL	81%	91% **	33%	***	***	***
Liliales	Liliaceae	Smilax	ornata	sarsaparilla		79%	79% **	-24%	***	***	***
Liliales	Liliaceae	Trillium	erectum	birthroot		79%	72% 43%	55%	***	***	***
Malvales	Malvaceae	Abutilon	unidentified	malflow seed	SD	78%	96% **	24%	1.5	28	18.7
Malvales	Sterculiaceae	Sterculia	lychnophora	luot uoi	FR	81%	82% 58%	31%	***	***	***
Musales	Marantaceae	Maranta	arundinacea	arrowroot		79%	100% **	43%	0.7	5	7.7
Musales	Musaceae	Musa	paradisica	banana blossom	FL	82%	75% 49%	22%	***	***	***
Myrtales	Balanophoraceae ¹⁰	Cynomorium	saugarium	caulis cynomorii	ST	83%	99% **	41%	2	15	7.5
Myrtales	Ouagraceae	Oenothera	biennis	primrose		78%	74% 52%	50%	***	***	***
Papaverales	Cappariaceae	Capparis	spinosa	caper berries	FR	80%	86% 66%	33%	***	***	***
Papaverales	Papaveraceae	Papaver	somniferum	poppy		80%	95% 90%	81%	***	***	***
Papaverales	Papaveraceae	Papaver	somniferum	poppy	SD	87%	100% **	47%	1.5	30	20
Plantaginiales	Plantaginaceae	Papaver	somniferum	poppy	PL	79%	80% 60%	-42%	***	***	***
Plantaginiales	Plantaginaceae	Plantago	psyllium	psyllium		79%	76% **	19%	***	***	***
Polemoniales ⁷	Boraginaceae ⁶	Cordia	tetrandra			78%	80% **	18%	***	***	***
Polemoniales ⁷	Convolvulaceae	Ipomoea	aquatica	water spinach		91%	79% **	38%	***	***	***
Polemoniales ⁷	Solanaceae	Capsicum	annuum	pasilla Chile pepper	FR	76%	64% 32%	33%	***	***	***
Polemoniales ⁷	Solanaceae	Capsicum	annuum	pepper		83%	100% **	69%	0.75	8	10.7
Polemoniales ⁷	Solanaceae	Capsicum	annuum	pepper		77%	73% 71%	24%	***	***	***
Polemoniales ⁷	Solanaceae	Capsicum	chinense	Chinese pepper	FR	84%	83% 69%	49%	***	***	***
Polemoniales ⁷	Solanaceae	Solanum	melongena	eggplant		80%	100% **	65%	***	***	***
Polemoniales ⁷	Solanaceae	Solanum	tuberosum	potato		78%	100% **	41%	2	12	6
Polemoniales ⁷	Solanaceae	Solanum	tuberosum	potato		76%	100% **	31%	***	***	***
Polemoniales ⁷	Solanaceae	Solanum	tuberosum	potato		76%	72% **	16%	***	***	***
Polemoniales ⁷	Solanaceae	Solanum	tuberosum	potato		75%	99% **	37%	1.8	18	10
Ranales	Menispermaceae	Cissampelos	mucronata	jenjoko, muguita		75%					

10

20

30

40

50

表 1 - COX-2を阻害する食用植物からの抽出物

目	科	属	種	英名	器官	1°アッセイ COX-2 (%阻害) 10 ug/ml	確認アッセイ COX-2 (%阻害) 10 ug/ml 3.3 ug/ml 1.1 ug/ml	COX-1 (%阻害) 10 ug/ml	IC50 (ug/ml) COX-2	IC50 (ug/ml) COX-1	選択性 COX-2/COX-1
Rosales	Fabaceae	Acacia	sieberiana	miwunga (Africa)		79%	49%	99%	***	***	***
Rosales	Fabaceae	Albizia	julibrissin	miwunga		82%	84%	41%	***	***	***
Rosales	Fabaceae	Glycine	max	soybean	SD	76%	89%	53%	***	***	***
Rosales	Fabaceae	Phaseolus	vulgaris var. Peruvian	Peruvian bean	SD	85%	67%	37%	***	***	***
Rosales	Fabaceae	Trigonella	foetum-graecum	fenugreek		76%	92%	25%	***	***	***
Rosales	Fabaceae	Vigna	umbellata	red bean		79%	100%	32%	***	***	***
Rosales	Fabaceae	Vigna	unguiculata	long bean		78%	82%	61%	***	***	***
Rubiales	Rubiaceae	Asperula	odorata	woodruff	FR	87%	90%	29%	1.5	4	2.7
Rubiales	Valerianaceae	Valeriana	officinalis	valerian root	RT	82%	100%	39%	***	***	***
Rubiales	Rutaceae	Citrus	limonia	lime		84%	83%	7%	1.5	35	23
Rubiales	Rutaceae	Citrus	unidentified			83%	93%	21%	0.7	15	21
Scrophulariales	Acanthaceae	Acanthus	arbores	ozagalo		78%	44%	11%	***	***	***
Umbellales	Apiaceae	Angelica	sinensis	angelica; dong quai tea		76%	89%	52%	***	***	***
Umbellales	Apiaceae	Carum	carvi	black caraway		92%	81%	53%	***	***	***
Umbellales	Apiaceae	Centella	asiatica	gotu kola		75%	69%	-119%	***	***	***
Umbellales	Apiaceae	Eryngium	foetidum	coyote culantro; fitweed		90%	88%	35%	***	***	***
Umbellales	Apiaceae	Peucedanum	unidentified		RT	78%	100%	12%	0.9	4	4.4
Urticales	Moraceae	Morus	alba	fructus mori; gishi-gishi	FR	80%	88%	5%	1	20	20
Urticales	Ulmaceae	Ulmus	rubra	slippery elm		75%	60%	28%	***	***	***
Violales	Flacourtiaceae	Pongium	edule	kluwat; pakem	FR	80%	90%	47%	***	***	***
Violales	Passifloraceae	Passiflora	edulis	passion flower	PX	86%	65%	-10%	***	***	***

10

20

30

40

50

【 0 0 6 0 】

一次スクリーニングは3種の濃度で行った。試料を一のCOX-2確認アッセイ中で繰り返さ

なかった。

* * アッセイエラーによりデータなし。

* * * 試験せず。

¹ BrassicalesはSapindales又はRutalesとしても分類される。

² BrassicaceaeはCruciferaeとしても分類される。

³ PoaceaeはGraminaeとしても分類される。

⁴ LamiaceaeはLabiataeとしても分類される。

⁵ ApiaceaeはUmbelliferaeとしても分類される。

⁶ BoraginaceaeはCordiaceaeあるいはEhretiaceaeとしても分類される。

⁷ PolemonialesはSolanalesとしても分類される。

⁹ PandanalesはAralesあるいはAlismatalesとしても分類される。

¹⁰ BalanophoraceaeはCynomoriaceaeとしても分類される。

【 0 0 6 1 】

抽出物のC O X -2およびC O X -1阻害活性を試験した各植物の目、科、属、および種を示す。

表1に示したC O X -2阻害を試験した各植物抽出物の特定の食用としての使用を説明した記述を以下の表2に示す。アルファベット順に属を並べて植物を表にした。さらに、これらの植物の食用としての消費を記述する当業界に公知の参考文献の総覧を示す。

【 0 0 6 2 】

【 表 4 】

10

20

表 2 植物抽出物の食べ物としての使用

索引	学名	英名	単離物質/ 化合物 ID	試料 ID	抽出 物番 号	参考 文献
140	アブチロン未同定種 (Abutilon unidentified)	Mallows 種子が食用。	78916	914485		
96	アカシア・シエベリアナ (Acacia sieberiana)	muwunga (アフリカ語)	78486	914134		2
上質の透明なゴムを生成する。充填剤としてアラビアゴムと同様に用いる。						
1	アカンサス・アルボレウス (Acanthus arboreus)	otagalo	78487	914135		1、2
葉は咀嚼剤として用いる。						
17	アコルス・カラムス (Acorus calamus)	Calamus root (ショウブ の根茎)	80328	922701		1、 2、 3、4
根茎をキャンディにする。アルコール性飲料の香味剤としても用いられる。						
18	アコルス・グラミネウス (Acorus gramineus)	Shih-chang	79050	914619		2
根茎は食用。						
129	アルビジア・ジュリブリシ ン(Albizzia julibrissin)	mimosa (ミモザ)	76892	912334		2
若葉は煮た後食用とする。						
130	アリウム・スコエノピラス ム(Allium schoenoprasum)	Chinese chives (ニラ)	78569	914138		1、 2、 3、4
葉をサラダ、スープおよびオムレツに入れて食べる。						
229	アリウム未同定種(Allium unidentified)	多くの種が食用。	79513	914847		
5	アルテルナンテラ・プンゲ ンス(Arternanthera pungens)	いがのある実を生じる雑 草	78470	914119		1、2
若葉が食用。						
10	アンジェリカ・シネンシス (Angelica sinensis)	angelica (アンゼリ カ)、Dong quai tea	79771	922605		3
根をスープに入れて食べる。						
31	アリストロキア未同定種 (Aristolochia unidentified)	コントルタ(contorta)お よび(debilis)の葉は煮 て食用にする。	79611	914945		
32	アリストロキア未同定種 (Aristolochia unidentified)	コントルタ(contorta)お よび(debilis)の葉は煮 て食用にする。	79611	915905		
35	アルテミシア・ドラクンク ルス(Artemisia dracunculus)	tarragon (エストラゴ ン)	78683	914252		3
葉は焼くかあるいはサラダで食べる。						

10

20

30

40

【 0 0 6 3 】

【 表 5 】

34	アスクレピアス・ツベローサ(Asclepias tuberosa)	pleurisy root (ヤナギトウワタ)	80399	922772		1、 2、3
加熱した鞘は食用。柔らかい新芽は緑黄色野菜として食べる。根は加熱して食べる。						
185	アスペルラ・オドラータ(Asperula odorata)	woodruff (クルマバソウ)	80436	922809		1、 2、3
この植物は飲料の香味剤として用いる。						
37	アステル未同定種(Aster unidentified)	多くの種の若葉は食用。	78941	914510		
75	ブルメア・アラータ(Blumea alata)	他の種類の葉は食用。	78477	914125		
63	ブラシカ・ラパ(Brassica rapa)	Choy sum	78573	914142		1、 2、 3、4
57	ブラシカ・ラパ(Brassica rapa)	turnip	78567	914136		1、 2、4
根を生で、摩り下ろして、加熱して、スープに入れてあるいはピクルスにして食べる。						
65	カッパリス・スピノーサ(Capparis spinosa)	Caper berries	79419	914753		1、 2、 3、4
花芽はピクルスにして食べる。						
58	カプセルラ・ブルサ・パストリス(Capsella bursa-pastris)	shepherd's purse (ナズナ)	80400	922773		1、 2、3
本植物は野菜として使用する。						
206	カプシクム・アンヌウム(Capsicum annuum)	pepper (コショウ)	79789	922623		1、 2、 3、4
207	カプシクム・アンヌウム(Capsicum annuum)	pepper (コショウ)	78583	914152		1、 2、 3、4
212	カプシクム・アンヌウム(Capsicum annuum)	Pasilla Chile pepper	78624	914193		1、 2、 3、4
鞘および若葉は食用。						
208	カプシクム・キネンス(Capsicum chinense)	Chinese pepper	78581	914150		6
果実は食用。						
12	カルム・カルビ(Carum carvi)	black caraway	78630	914199		1、 2、 3、4
新芽と葉は食用。種子は香味剤として用いる。						
254	カスタネア・サティバ(Castanea sativa)	Spanish chestnut	78865	914434		1、 2、 3、4
ほとんどの種の果実は食用。						

10

20

30

40

【 0 0 6 4 】

【 表 6 】

13	センテラ・アジアチカ (<i>Centella asiatica</i>)	gotu kola	78454	914103		1、 2、 3、4
このハーブはサラダで食用にする。一部の国で調理して食べる。						
38	チコリウム・エンディビア (<i>Cichorium endivia</i>)	endive (エンダイブ)	78703	914272		3
葉をサラダあるいは煮野菜として食用とする。						
142	シスアムペロス・ムクロナ タ(<i>Cissampelos mucronata</i>)	jenjoko, mugulita	78485	914133		1、3
NAPRALERT に食用と記載されているが詳細な記述はない。						
77	シトラルス・ブルガリス (<i>Citrullus vulgaris</i>)	watermelon (スイカ)	79763	922597		2
熟した果実は食用。種子は乾燥して食用にする。						
195	シトラス・リモニア (<i>Citrus limonia</i>)	lime (ライム)	78593	914162		3
ジュースは食品に酸味を加えるために用いる。飲料としても用いる。						
196	シトラス未同定種(<i>Citrus unidentified</i>)	ほとんどの種は食用(オ レンジ、ライム、レモ ン、など)	77669	912496		
163	コイクス・ラクリマ・ジョ ビ(<i>Coix lacryma jobi</i>)	Job's tears (ハトム ギ)	80461	922834		1、 2、3
日本、ベトナムなどでは種子を茶として用いる。種子は穀物として、かゆ、スープまたはペストリー に入れて食べる。						
22	コロカシア・エスクレンタ (<i>Colocasia esculenta</i>)	Malanga coco	78076	912918		1、 2、 3、4
23	コロカシア・エスクレンタ (<i>Colocasia esculenta</i>)	Dried taro stem (乾燥 したタロイモの茎)	79794	922628		1、 2、 3、4
塊茎は、煮て、油で炒めて、蒸して、スープに入れて(W. Honsyu において新年を祝う味噌汁に欠かせ ない)、擦って団子にして、あるいはデンプン源として用いて食用とする。若い葉と茎は野菜として食 べるかあるいは日に乾して保存する。						
86	コルディア・テトランドラ (<i>Cordia tetrandra</i>)	種名は不明。しかしなが らこの種類のいくつかの 種の果実は食用である。	77182	912455		
39	<i>Crassocephallum mannii</i>	ギヌラ・マンニイ (<i>Gynura mannii</i>)と思わ れる。種名は不明である が他の種類は食用。	78469	914118		
82	シノモリウム・サンガリク ム(<i>Cynomorium sangaricum</i>)	種名は不明。他の種類は 香辛料として使用。	79013	914582		

10

20

30

40

【 0 0 6 5 】

【 表 7 】

83	ディオスコレア・ミヌチフローラ (Dioscorea minutiflora)	bush yam	78483	914131		6
塊茎 (tubercules) は食用。						
84	ディオスコレア未同定種 (Dioscorea unidentified)	Yams ほとんどの塊茎は食用。	79323	914657		
249	Elaeagnus umbellata	Silver berries	76938	912365		5
果実は加熱すれば食用となる。						
167	Eleusine coracana	Sweet Indian millet	79796	922630		1、 2、 3、4
穀物は食用。						
14	エリンギウム・フォエチダム (Eryngium foetidum)	coyote culantro; fitweed	78570	914139		1、 2、 3、4
根をスープおよび肉料理に香辛料として用い、大変心地良い香りがつく。若い葉は生で、蒸して、あるいは米と一緒に料理して食べる。						
117	ギンコ・ピローバ (Ginkgo biloba)	ginkgo nuts (ギンナン)	78610	914179		3
種子 (木の実) は加熱あるいは乾燥して食用とする。						
111	Glycine max	Soy bean (ダイズ)	78995	914564		1、 2、 3、4
豆は食用。						
164	ホルデウム・ディスティコン (Hordeum distichon)	barley (オオムギ)	80506	922879		5
穀物は食用。ビールの製造に用いる。						
64	ヒロセレウス・ウンダタス (Hirocereus undatus)	Pitahaya (ピタヤ)	78839	914408		2
果実は食用。						
76	イポメア・アクアティカ (Ipomoea aquatica)	water spinach	78608	914177		1、 2、 3、4
葉および若くて管状の茎は野菜として用いる。						
134	リリウム未同定種 (Lilium unidentified)	Lilies (ユリ) 多くの種の根は食用。	79331	914665		
120	リコプス・ルキドゥス (Lycopus lucidus)	Herba Lycopi	79514	914848		2
根は煮るかあるいはスープに入れて食用とする。						
141	マランタ・アルンディナセア (Maranta arundinacea)	arrowroot (クズウコン)	78867	914436		3
塊茎は生で、油で炒めて、粗くすりつぶして食べるかあるいはくず粉の製造に用いる。						
145	モラス・アルバ (Morus alba)	Fructus Mori	79019	914588		2、4
果実は食用 (mulberry : クワ)						

10

20

30

40

【 0 0 6 6 】

【 表 8 】

78	Mukia maderaspatana	別名は Cucumis maderaspatana。キュウリ類。ほとんどの関連する種の果実は食用。	78458	914107		
147	ムサ・パラディシアカ (Musa paradisiaca)	Banana (バナナ)の花	78578	914147		1、2、3
果実および花は食用。						
121	オキムム・バジリクム (Ocimum basilicum)	Herba Ocimi	78971	914540		1、2、3
バジルは薬味として用いる。						
152	エノテラ・ビエンニス (Oenothera biennis)	primrose (サクラソウ)の花	80412	922785		1、2、3
根と新芽は食用；新芽はサラダとして食べる。						
165	オリザ・サティバ (Oryza sativa)	rice (コメ)。多くの変種が存在する。	79428	914762		1、2、3、4
166	Oryza sativa var. sticky sweet	Sticky sweet rice (もち米)	79796	922630		1、2、3、4
通常は煮るか蒸して食べるが、国によっては他の野菜と料理するかあるいはスープに入れて食べる。これはまた、ケーキ、ペストリー、プリンおよびデンプンに加工し、そして醗酵させてアルコール性飲料、酢および味噌の製造に用いられる。						
228	パンギウム・エツレ (Pangium edule)	Peeled kluwak nut	79314	914648		2
154	パパベル・ソムニフェルム (Papaver somniferum)	poppy (ケシ)	78646	914215		1、2、3、4
155	パパベル・ソムニフェルム (Papaver somniferum)	poppy (ケシ)	78612	914181		1、2、3、4
156	パパベル・ソムニフェルム (Papaver somniferum)	poppy (ケシ)	80445	922818		
有名な麻薬の一つであるアヘンは、その蒴果の乳状の分泌液から得られる。インドではこれを用いて飲料を製造する。中国では種苗を野菜として食用にする。種子はケーキ、パン、菓子、カレーに用い、また食用油の製造に用いる。						
157	パッシフローラ・エツリス (Passiflora edulis)	Passion flower (トケイソウ)	79382	914716		1、2、3
果実は食用。						
122	ペリラ・フルテスケンス (Perilla frutescens)	Folium Perillae (ソヨウ)	78955	914524		5
油脂は東洋料理に用いる。葉は薬味として用いる。						
227	プーセダヌム未同定種 (Peucedanum unidentified)	ほとんどの種が薬用、しかしながら一部の種類の葉と茎は食用。	78939	914508		

10

20

30

40

【 0 0 6 7 】

【 表 9 】

107	Phaseolus vulgaris var. Peruvian	ペルー産の豆	78646	914215		1、 2、 3、4
種子および鞘は食用。						
158	フィトラッカ・アメリカーナ(Phytolacca americana)	pokeweed (アメリカヤマゴボウ)	80393	922766		1、 2、 3、4
若芽は香味野菜として食べる。果実はワインおよび菓子の着色剤として用いる。						
162	プランタゴ・シリウム(Plantago psyllium)	psyllium seed (アメリカオオバコの種子)	80408	922781		3
発芽種子はサラダで食用にする。種子から栄養油が採れる。種子皮末粘液は増粘剤として用いる。						
268	ポリゴナム・アビクラレ(Polygonum aviculare)	Michi-yanagi (ミチヤナギ)	76896	912336		2、 3、4
葉は食用。						
269	ポリゴナム・セスピトスム(Polygonum caespitosum)	Ilana-tade (ハナタデ)	76928	912358		5
スープに入れて食用。						
170	ポリゴナム・オドラツム(Polygonum odoratum)	knotweed, smartweed	78837	914406		1、 2、3
魚や肉に用いる薬味。						
232	ポリゴナム未同定種(Polygonum unidentified)	多くの種が食用。	79569	914903		
123	プルネラ・ブルガリス(Prunella vulgaris)	Spica prunellae (カゴソウ)	79018	914587		1、 2、 3、4
この植物を冷水で煎じて飲料とする。						
173	ルメックス・ジャポニクス(Rumex japonicus)	Japanese dock	76821	912284		1、 2、3
葉は煮るかあるいはスープに入れて食べ、あるいは乾燥して保存して食べる。種子は米と一緒に食べるかあるいはひいて粉末にし、団子を作る。						
124	サルビア未同定種(Salvia unidentified)	Sages (セージ)ほとんどの種で植物全体が食用。	79492	914826		
43	シリブム・マリアナム(Silybum marianum)	milk thistle tea	79480	914814		1、 2、 3、4
若芽は春に煮て食べる。種子はローストしてコーヒーの代わりとして用いる。						
136	スミラックス・オルナータ(Smilax ornate)	sarsaparilla (サルサパリラ)	80404	922777		6
飲料の風味剤として用いる。						

10

20

30

【 0 0 6 8 】

【 表 1 0 】

214	ソラナム・メロンゲーナ (<i>Solanum melongena</i>)	eggplant (ナス)	78835	914404		1、 2、 3、4
果実は、料理して、スープに入れて、米と一緒に生で、シチューに入れて、油で揚げるかローストして、焼いて、あるいはピクルスにして食べる。極東地域において好まれる野菜の一つ。葉は米ぬかと塩でつける。						
215	ソラナム・ツベロスム (<i>Solanum tuberosum</i>)	potato (ジャガイモ)	79653	914987		1、 2、 3、4
216	ソラナム・ツベロスム (<i>Solanum tuberosum</i>)	potato (ジャガイモ)	79654	914988		1、 2、 3、4
217	ソラナム・ツベロスム (<i>Solanum tuberosum</i>)	potato (ジャガイモ)	79651	914985		1、 2、 3、4
塊茎は生ではサラダで食べる。料理して、蒸して、油で揚げ、すりつぶして、あるいは他の種々の料理にして食べる。多くの国々で主食として用いられ、また、デンプンおよびアルコールの必須の原料となる。						
44	ソックス・オレラセウス (<i>Sonchus oleraceus</i>)	chicory (チコリー)	78466	914115		1、 2、 3、4
若い葉は生で食べるかあるいは湯がいた後料理する。						
68	ステラリア・メディア (<i>Stellaria media</i>)	chickweed (ハコベ)	76809	912274		3
69	ステラリア・メディア (<i>Stellaria media</i>)	chickweed (ハコベ)	79762	922596		3
若い部分は食料不足時にゆで野菜として用いる。						
230	ステルクリア・リクノフォ ーラ (<i>Sterculia lychnophora</i>)	Luoi uoi	78838	914407		2
種子を飲料の製造に用いる。						
47	タラクサカム・モンゴリク ム (<i>Taraxacum mongolicum</i>)	Mansen-tampopo (モウコ タンボポ)	79523	914857		2、4
葉をゆで野菜として食べる。						
46	タラクサカム・オフィナ ル (<i>Taraxacum officinale</i>)	dandelion (タンボポ)	79478	914812		1、 2、 3、4
葉は水にさらすなどしてサラダで食べる。タンボポ酒の原料となる。根を、生で、煮て、あるいはコー ヒーの代用として用いる。						
110	トリゴネラ・フォウナム・ グラエカム (<i>Trigonella foenum-graecum</i>)	fenugreek seed (コロハ の種子)	78605	914174		1、 2、 3、4
種子はコーヒーに混ぜたり、スパイスとして用いる。葉および鞘は野菜として用いる。						

10

20

30

40

【 0 0 6 9 】

【 表 1 1 】

137	トリリウム・エレクタム (<i>Trillium erectum</i>)	bethroot (エンレイソウ)	79018	914587		1、 2、 3、4
若い葉はサラダに入れて、また香味野菜として食べる。						
225	ウルムス・ルブラ(<i>Ulmus rubra</i>)	slippery elm bark tea	79479	914699		3
樹皮の粉末は食用。甘くて粘液質の内皮を噛む。						
236	バレリアナ・オフィシナリス(<i>Valeriana officinalis</i>)	Valerian root (カノコソウの根)	79365	914699		1、 3、4
根をアイスクリームの風味付けなどに用いる。ハーブティーにも用いる。						
112	ビグナ・ウンベラータ (<i>Vigna umbellata</i>)	red bean (アズキ)	78604	914173		1、3
若い葉と鞘は蒸して食用にする。乾燥した種子は煮たり、米と一緒に食べたり、スープで食べたりする。						
113	ビグナ・ウングイクラタ (<i>Vigna unguiculata</i>)	long bean	78580	914149		1、 2、 3、4
種子は煮たり、蒸したりあるいは油で炒めたりして食用にする。乾燥した種子はスープに用いる。						
273	ビテックス・アグヌス・カストゥス(<i>Vitex agnus-castus</i>)	Chaste lamb	79481	914815		4
ほとんどの種の果実は食用。						
26	キサントソーマ・サギッテ イフォリウム(<i>Xanthosoma sagittifolium</i>)	Malanga	78574	914143		1、 2、 3、4
27	キサントソーマ・サギッテ イフォリウム(<i>Xanthosoma sagittifolium</i>)	Malanga	78575	914144		1、 2、 3、4
塊茎をタロイモと同様に食べる。						
4	ユッカ・エレファンティペ ス(<i>Yucca elephantipes</i>)	Spanish dagger; izote	77717	912504		3
花と若い茎頂は食用。						
169	ゼア・マيس(<i>Zea mays</i>)	corn (トウモロコシ)	79625	914959		1、 2、 3、4
主要な穀類。						

10

20

30

【 0 0 7 0 】

参考文献

1. NAPRALERT (NATURAL Products ALERT)

1650 A . D . から現在までの116,000以上の科学研究論文および本からの抽出情報を現在
 収納している。NAPRALERTデータベースは、Department of Medicinal Chemistry and Pha
 rmacognosy (College of Pharmacy of the University of Illinois at Chicago, 833 So
 uth Wood Street (M/C 877) 米国イリノイ州シカゴ60612) の中の the Program for Coll
 aborative Research in the Pharmaceutical Sciences (PCRPS)により収納し保存されて
 いる。

40

2. Tyozaburo Tanaka, (Sasuke Nakao監修) Tanaka's Cyclopedica of Edible Plants of the World, Keigaku Publishing Co. 日本、東京(1976年)

世界の重要な野生種を含む11,000種の植物の概説である。この本は、世界の食用植物に
 関する主要な参考文献の一つと考えられる。

3. Stephen Facciola, Cornucopia II : A Source Book of Edible Plants, Kampong Publications, カリフォルニア州ピスタ (1998年)

50

この本は米国および米国以外の国で得られる3,000種以上を記載している。

4. James A. Duke, Database of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants, CRC Press, フロリダ州ボークラトーン (1992年)

約1000種の植物と約3000種の化合物のデータベース。

5. George Macdonald Hocking, Dictionary of Natural Products, Plexus Publishing, Inc., ニュージャージー州メドフォード (1997年)

"天然の医学薬学物質とその起源となる植物、動物および鉱物に関する生薬学の領域の用語"。この文献は、18,000以上の項目を有する。

6. Enrique Sanchez-Monge, Flora Agricola : Taxonomia de las Magnoliofitas (Angiospermas) de interes agricola, con excepcion de las de aprovechamiento exclusivamente ornamental o forestal, Ministerio de Agriculture, Pesca y Alimentacion, スペイン・マドリッド (出版年不明)。

植物と多言語における一般名と世界の農業生物の商業用途を記載したスペイン語で書かれた優れた参考文献。

7. Anthony R. Torkelson, The Cross Name Index to Medicinal Plants, Volumes I-IV, CRC Press, フロリダ州ボークラトーン (1998-1999)。

8. Umberto Quattrocchi, CRC World Dictionary of Plant Names : Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology (Volumes 1-4), CRC Press, フロリダ州ボークラトーン (2000)。

9. W³TROPICOS Missouri Botanical Garden's VAST (VAscular Tropicos) の命名データベースおよび関連出典ファイルへのアクセスを提供するウェブサイト。

10. Webster's Ninth New Collegiate Dictionary, Merriam-Webster Inc., マサチューセッツ州スプリングフィールド (1983)。

表1で特定した群から分離した特定の抽出物のCOX-2選択的阻害能力を、表3-24でさらに例をあげる。種々の抽出物を用いて全部で6つの異なる濃度でCOX-1およびCOX-2の両方の阻害能力を試験した。COX-1およびCOX-2のIC₅₀値も決定し、次いで前記のように選択比を計算した。図1-22は表3-24に示したデータをグラフで示したものである。

【0071】

【表12】

表3 ビテックス・アグヌス・カストゥス (Vitex agnus-castus)

から分離した抽出物

抽出物の量(μg/ml)	対照と比較したCOX-1活性	対照と比較したCOX-2活性
100	33%	測定せず
33.3	62%	5%
11.1	測定せず	13%
3.70	78%	31%
1.23	88%	57%
0.41	98%	79%

IC ₅₀ (μg/ml) COX-1	IC ₅₀ (μg/ml) COX-2	COX-2選択比
50	1.5	33.3

【0072】

【表13】

10

20

30

40

表4 シトラス・リモニア (Citrus limonia) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較したC OX-1 活性	対照と比較したC OX-2 活性
100	19%	測定せず
33. 3	52%	測定せず
11. 1	70%	測定せず
3. 70	79%	22%
1. 23	92%	51%
0. 41	98%	69%

10

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
35	1. 5	23. 3

【 0 0 7 3 】

【 表 1 4 】

表5 シトラス類 (Citrus sp.) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較したC OX-1 活性	対照と比較したC OX-2 活性
100	16%	4%
33. 3	37%	4%
11. 1	測定せず	7%
3. 70	67%	16%
1. 23	80%	35%
0. 41	88%	64%

20

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
15	0. 7	21. 4

30

【 0 0 7 4 】

【 表 1 5 】

表6 パパベル・ソムニフェルム (Papaver somniferum) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較したC OX-1 活性	対照と比較したC OX-2 活性
100	26%	測定せず
33. 3	46%	測定せず
11. 1	65%	5%
3. 70	67%	26%
1. 23	81%	55%
0. 41	88%	72%

40

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
30	1. 5	20. 0

【 0 0 7 5 】

【 表 1 6 】

表7 モラス・アルバ (*Morus alba*) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較したC OX-1 活性	対照と比較したC OX-2 活性
100	33%	5%
33. 3	45%	9%
11. 1	測定せず ^a	9%
3. 70	68%	20%
1. 23	80%	44%
0. 41	103%	71%

10

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
20	1	20. 0

【 0 0 7 6 】

【 表 1 7 】

表8 アブチロン類 (*Abutilon* sp.) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較したC OX-1 活性	対照と比較したC OX-2 活性
100	23%	測定せず ^a
33. 3	44%	5%
11. 1	74%	7%
3. 70	76%	35%
1. 23	89%	54%
0. 41	113%	82%

20

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
28	1. 5	18. 7

30

【 0 0 7 7 】

【 表 1 8 】

表9 コイクス・ラクリマ (*Coix lacryma*) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較したC OX-1 活性	対照と比較したC OX-2 活性
100	14%	測定せず ^a
33. 3	51%	5%
11. 1	測定せず ^a	11%
3. 70	100%	39%
1. 23	95%	59%
0. 41	105%	80%

40

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
35	2	17. 5

【 0 0 7 8 】

【 表 1 9 】

表 10 アルテミシア・ドラクンクルス (*Artemisia dracunculus*)

から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較した C OX-1 活性	対照と比較した C OX-2 活性
100	27%	測定せず ^a
33. 3	41%	1%
11. 1	66%	5%
3. 70	81%	23%
1. 23	82%	51%
0. 41	90%	75%

10

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
22	1.5	14.7

【 0 0 7 9 】

【 表 2 0 】

表 11 ユッカ・エレファンティペス (*Yucca elephantipes*) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較した C OX-1 活性	対照と比較した C OX-2 活性
100	4%	測定せず ^a
33. 3	28%	3%
11. 1	測定せず ^a	11%
3. 70	66%	32%
1. 23	79%	56%
0. 41	105%	80%

20

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
10	0.7	14.3

30

【 0 0 8 0 】

【 表 2 1 】

表 12 ルメックス・ジャポニクス (*Rumex japonicus*) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較した C OX-1 活性	対照と比較した C OX-2 活性
100	10%	1%
33. 3	30%	3%
11. 1	測定せず ^a	5%
3. 70	63%	15%
1. 23	72%	35%
0. 41	88%	62%

40

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
9	0.65	13.8

【 0 0 8 1 】

【 表 2 2 】

表 13 ディオスコレア・ミヌチフローラ (*Dioscorea minutiflora*)

から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較したC OX-1 活性	対照と比較したC OX-2 活性
100	測定せず	測定せず
33. 3	18%	測定せず
11. 1	69%	測定せず
3. 70	90%	24%
1. 23	95%	50%
0. 41	109%	70%

10

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
18	1.5	12.0

【 0 0 8 2 】

【 表 2 3 】

表 14 カプシカム・アヌウム (*Capsicum annuum*) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較したC OX-1 活性	対照と比較したC OX-2 活性
100	16%	7%
33. 3	26%	9%
11. 1	41%	11%
3. 70	72%	18%
1. 23	99%	38%
0. 41	112%	65%

20

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
8	0.75	10.7

30

【 0 0 8 3 】

【 表 2 4 】

表 15 シスアムペロス・ムクロナタ (*Cissampelos mucronata*)

から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較したC OX-1 活性	対照と比較したC OX-2 活性
100	9%	測定せず
33. 3	35%	測定せず
11. 1	58%	8%
3. 70	72%	34%
1. 23	83%	58%
0. 41	98%	83%

40

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
18	1.8	10.0

【 0 0 8 4 】

【 表 2 5 】

50

表 16 チコリウム・エンディビア (*Cichorium endivia*) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較した C OX-1 活性	対照と比較した C OX-2 活性
100	9%	2%
33. 3	51%	8%
11. 1	測定せず	27%
3. 70	93%	46%
1. 23	98%	78%
0. 41	104%	98%

10

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
35	3. 5	10. 0

【 0 0 8 5 】

【 表 2 6 】

表 17 アステル類 (*Aster* sp.) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較した C OX-1 活性	対照と比較した C OX-2 活性
100	測定せず	測定せず
33. 3	17%	測定せず
11. 1	測定せず	1%
3. 70	66%	23%
1. 23	78%	40%
0. 41	90%	69%

20

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
7. 5	0. 8	9. 4

30

【 0 0 8 6 】

【 表 2 7 】

表 18 マランタ・アルンディナセア (*Maranta arundinacea*) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較した C OX-1 活性	対照と比較した C OX-2 活性
100	測定せず	測定せず
33. 3	7%	測定せず
11. 1	26%	測定せず
3. 70	57%	10%
1. 23	65%	34%
0. 41	82%	60%

40

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
5	0. 65	7. 7

【 0 0 8 7 】

【 表 2 8 】

表 19 シノモリウム・サンガリクム (*Cynomorium sangaricum*)

から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較した C O X-1 活性	対照と比較した C O X-2 活性
100	7%	測定せず
33. 3	31%	測定せず
11. 1	57%	3%
3. 70	75%	37%
1. 23	74%	57%
0. 41	84%	75%

10

IC ₅₀ (μ g / m l) C O X-1	IC ₅₀ (μ g / m l) C O X-2	C O X-2 選択比
15	2	7.5

【 0 0 8 8 】

【 表 2 9 】

表 20 ソラナム・ツベロスム (*Solanum tuberosum*) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較した C O X-1 活性	対照と比較した C O X-2 活性
100	13%	7%
33. 3	27%	14%
11. 1	50%	19%
3. 70	82%	31%
1. 23	96%	62%
0. 41	102%	86%

20

IC ₅₀ (μ g / m l) C O X-1	IC ₅₀ (μ g / m l) C O X-2	C O X-2 選択比
12	2	6.0

30

【 0 0 8 9 】

【 表 3 0 】

表 21 サルビア類 (*Salvia* sp.) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較した C O X-1 活性	対照と比較した C O X-2 活性
100	15%	8%
33. 3	27%	10%
11. 1	64%	22%
3. 70	85%	47%
1. 23	95%	80%
0. 41	107%	88%

40

IC ₅₀ (μ g / m l) C O X-1	IC ₅₀ (μ g / m l) C O X-2	C O X-2 選択比
18	3.5	5.1

【 0 0 9 0 】

【 表 3 1 】

表 22 ステラリア・メディア (Stellaria media) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較したC OX-1 活性	対照と比較したC OX-2 活性
100	13%	8%
33. 3	27%	12%
11. 1	71%	23%
3. 70	82%	51%
1. 23	99%	86%
0. 41	126%	115%

10

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
20	4	5. 0

【 0 0 9 1 】

【 表 3 2 】

表 23 プーセダヌム類 (Peucedanum sp.) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較したC OX-1 活性	対照と比較したC OX-2 活性
100	3%	1%
33. 3	23%	5%
11. 1	測定せず	12%
3. 70	51%	25%
1. 23	70%	41%
0. 41	88%	69%

20

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
4	0. 9	4. 4

30

【 0 0 9 2 】

【 表 3 3 】

表 24 アスペルラ・オドラータ (Asperula odorata) から分離した抽出物

抽出物の量(μ g / m l)	対照と比較したC OX-1 活性	対照と比較したC OX-2 活性
100	測定せず	測定せず
33. 3	1%	5%
11. 1	28%	6%
3. 70	52%	26%
1. 23	68%	55%
0. 41	74%	84%

40

IC ₅₀ (μ g / m l) COX-1	IC ₅₀ (μ g / m l) COX-2	COX-2 選択比
4	1. 5	2. 7

【 0 0 9 3 】

これらのデータに例証されるように、記載した植物から分離した有機抽出物は、COX - 2を阻害する。実際、いくつかの抽出物はCOX - 1に対してCOX - 2を10倍以上選択的に阻害する。前記を考慮すれば、本発明のいくつかの目的が達成され、かつ他の好都合な

50

効果が達成されていることが理解されるであろう。

【0094】

本発明のこれらのおよび他の特徴、側面、および利点は、本発明の詳細な説明、本特許請求の範囲および以下に添付した図によりさらに理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図1】ビテックス・アグヌス・カストゥス(Vitex agnus-castus)から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図2】シトラス・リモニア(Citrus limonia) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図3】シトラス類(Citrus sp.) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図4】パパベル・ソムニフェルム(Papaver somniferum) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図5】モラス・アルバ(Morus alba) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図6】アブチロン類(Abutilon sp.) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図7】コイクス・ラクリマ(Coix lacryma) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図8】アルテミシア・ドラクンクルス(Artemisia dracunculus) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図9】ユッカ・エレファンティペス(Yucca elephantipes) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図10】ルメックス・ジャポニクス(Rumex japonicus) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図11】ディオスコレア・ミヌチフローラ(Dioscorea minutiflora) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図12】カプシカム・アヌウム(Capsicum annuum) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図13】シスアムペロス・ムクロナタ(Cissampelos mucronata) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図14】チコリウム・エンディビア(Cichorium endivia) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図15】アステル類(Aster sp.) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図16】マランタ・アルンディナセア(Maranta arundinacea) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図17】シノモリウム・サンガリクム(Cynomorium sangaricum) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図18】ソラナム・ツベロスム(Solanum tuberosum) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図19】サルビア類(Salvia sp.) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図20】ステラリア・メディア(Stellaria media) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図21】プーセダナム類(Peucedanum sp.) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

【図22】アスペルラ・オドラータ(Asperula odorata) から分離した抽出物によるCOX-2>COX-1阻害を示す。

10

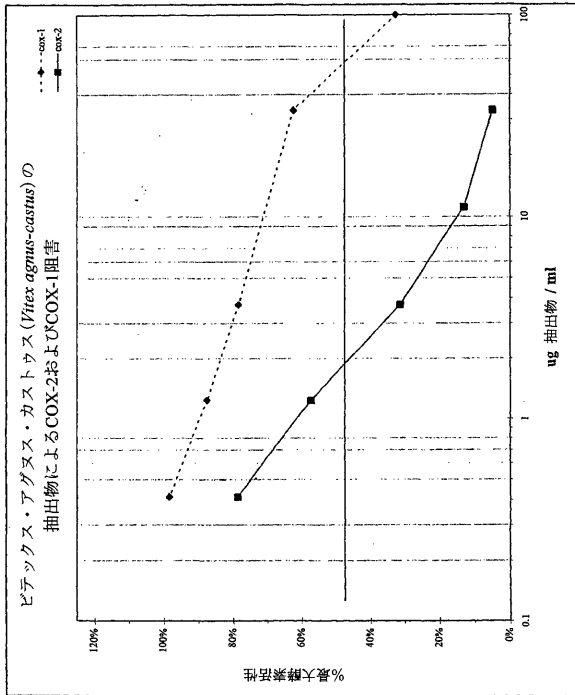
20

30

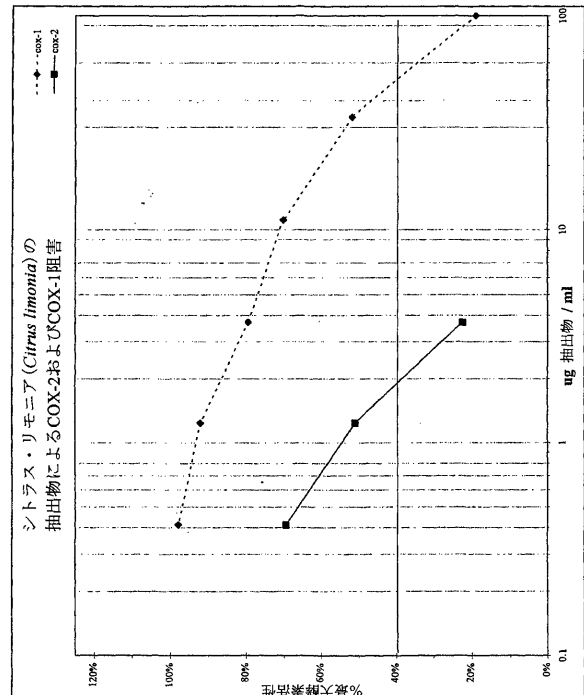
40

50

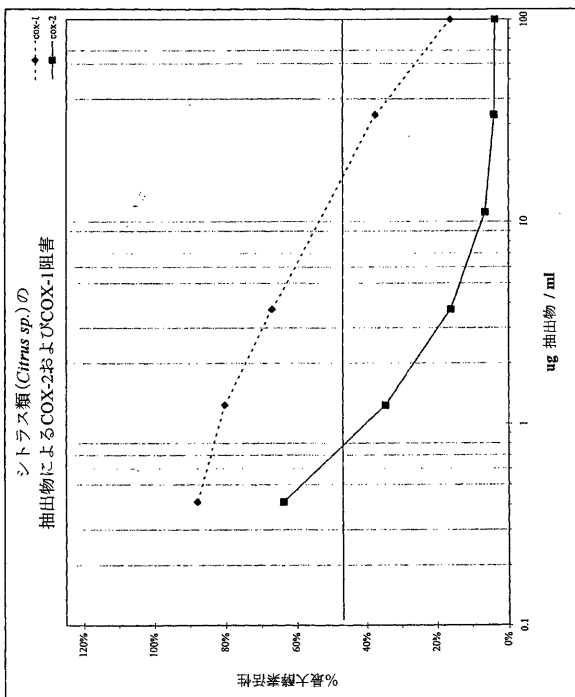
【図 1】



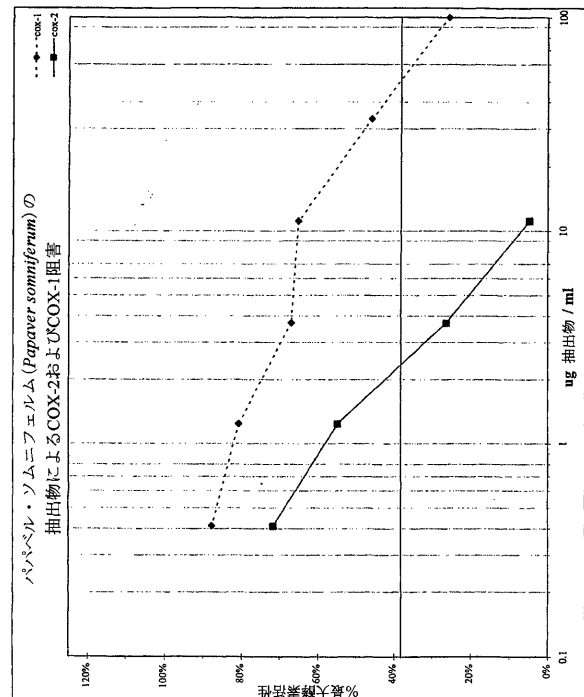
【図 2】



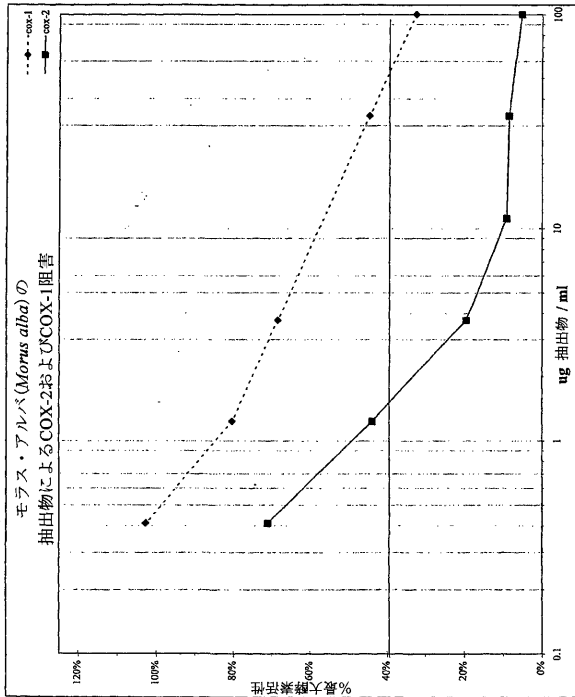
【図 3】



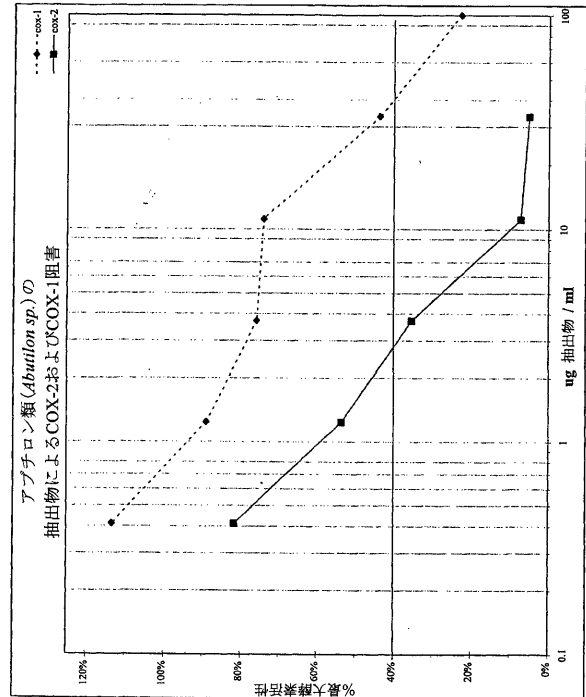
【図 4】



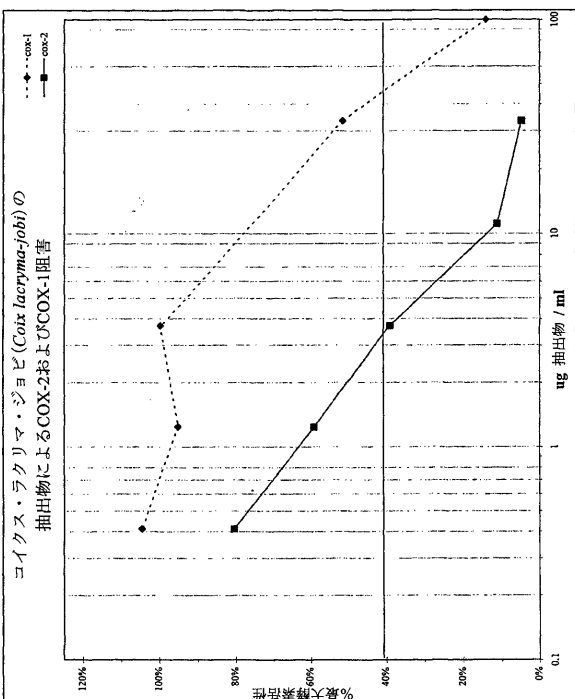
【 図 5 】



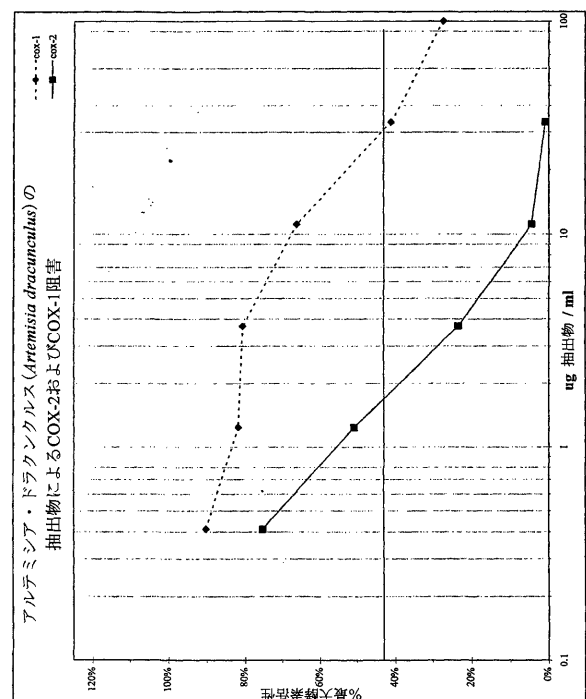
【 図 6 】



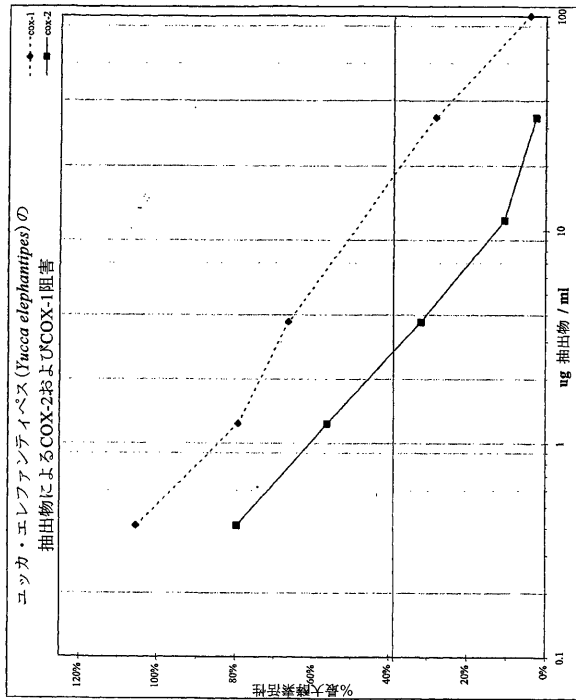
【 図 7 】



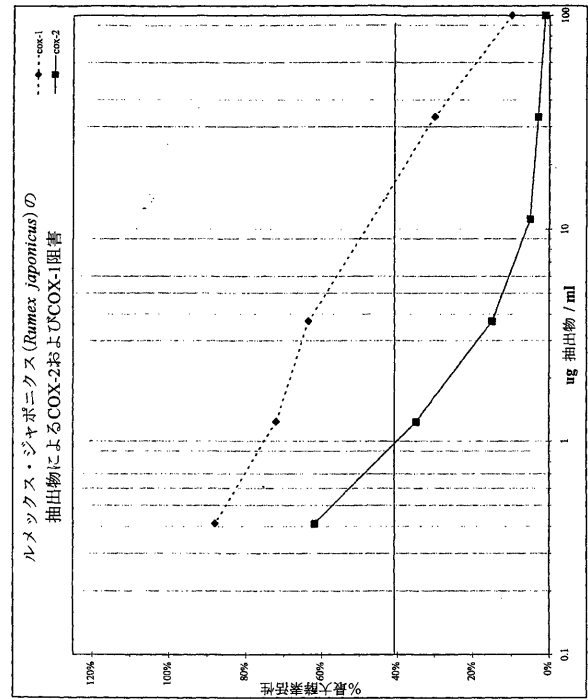
【 図 8 】



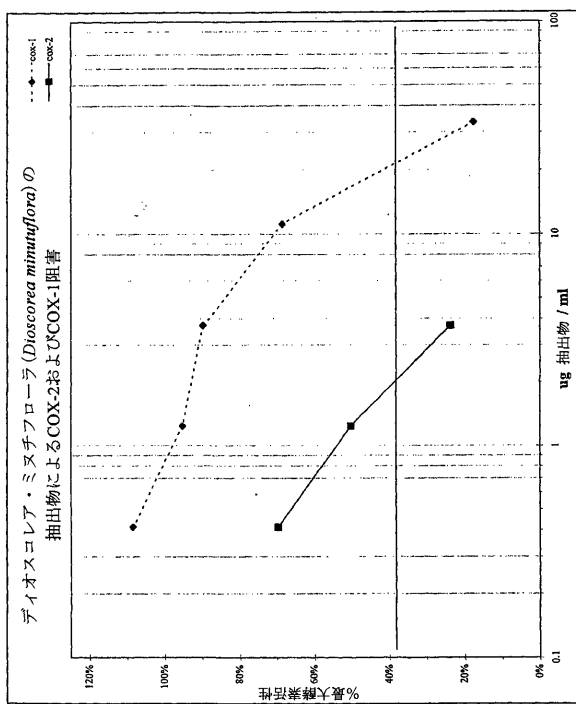
【図 9】



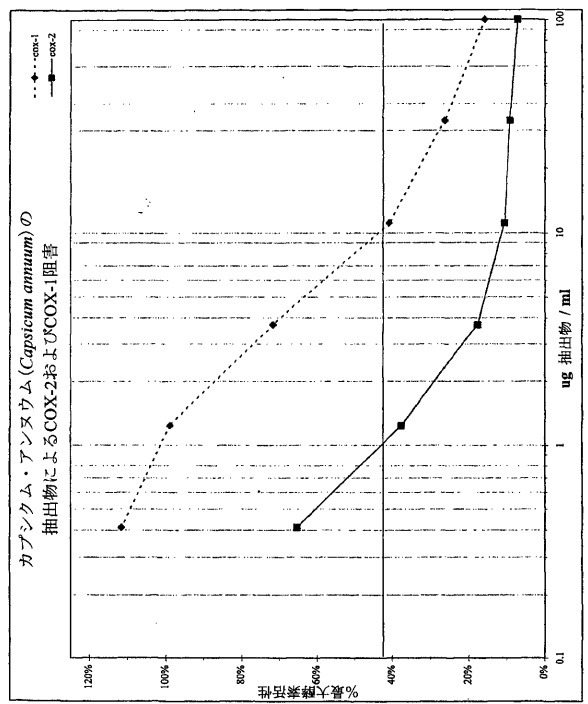
【図 10】



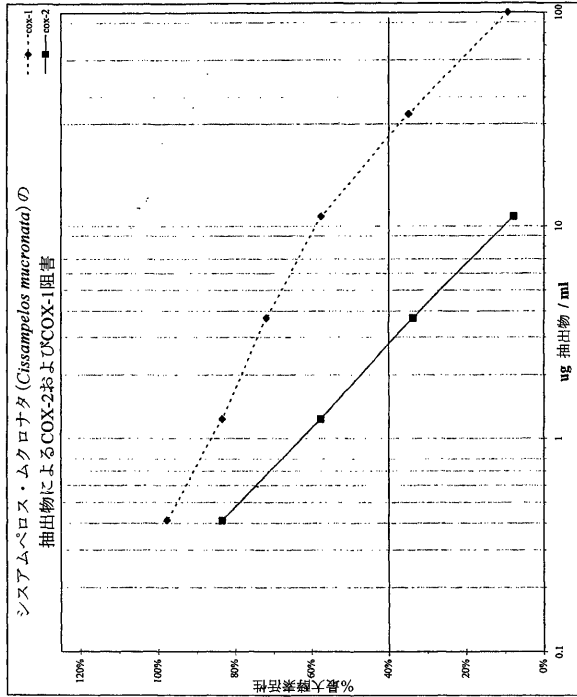
【図 11】



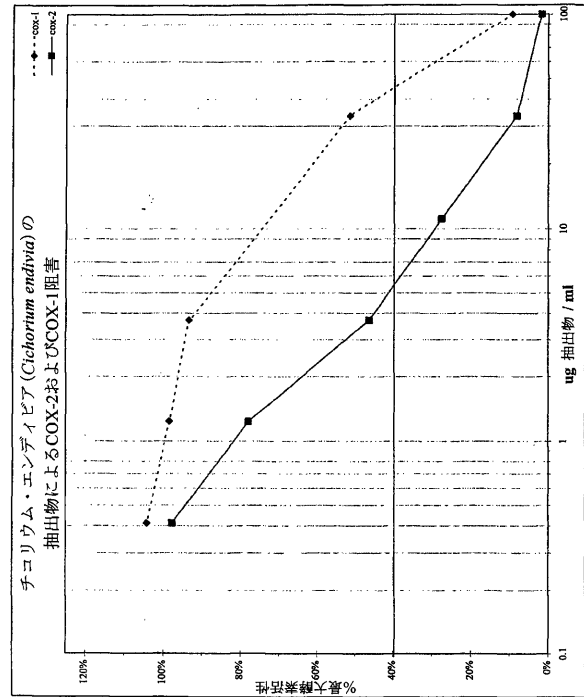
【図 12】



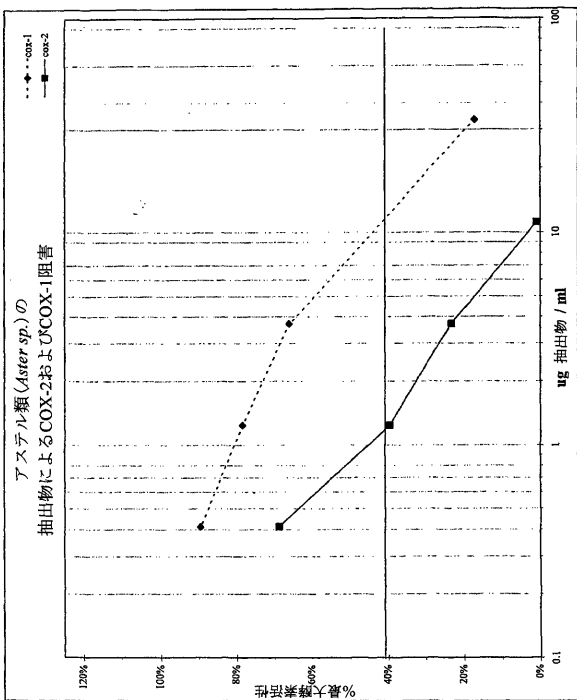
【図 13】



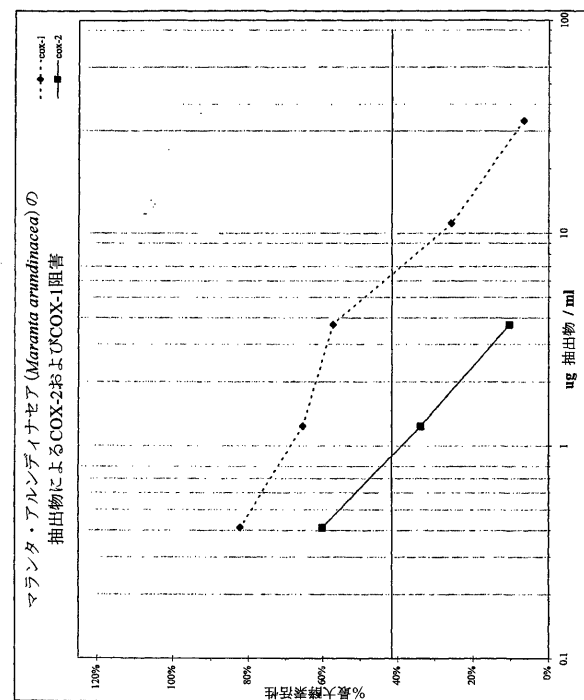
【図 14】



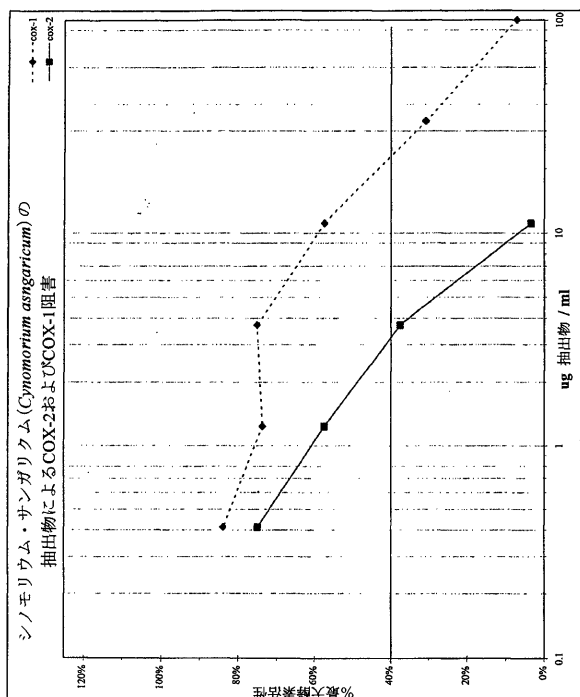
【図 15】



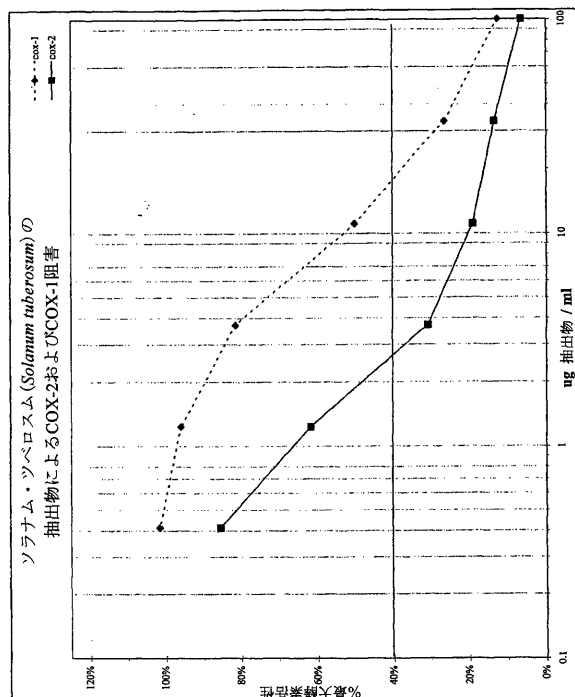
【図 16】



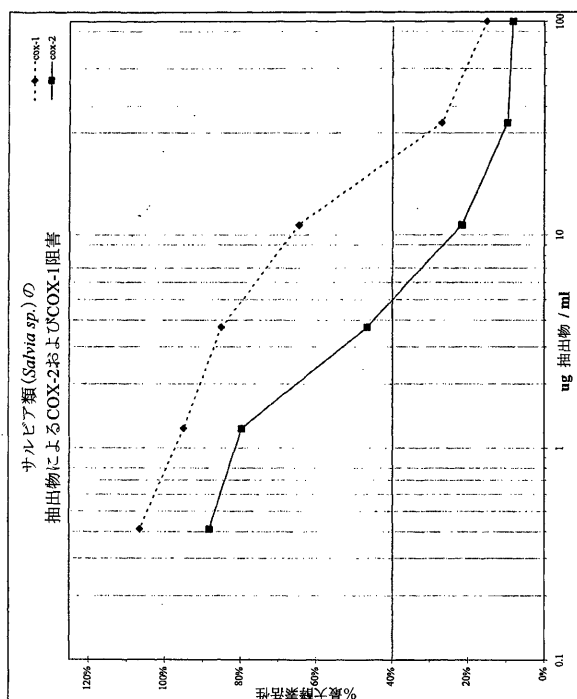
【図 17】



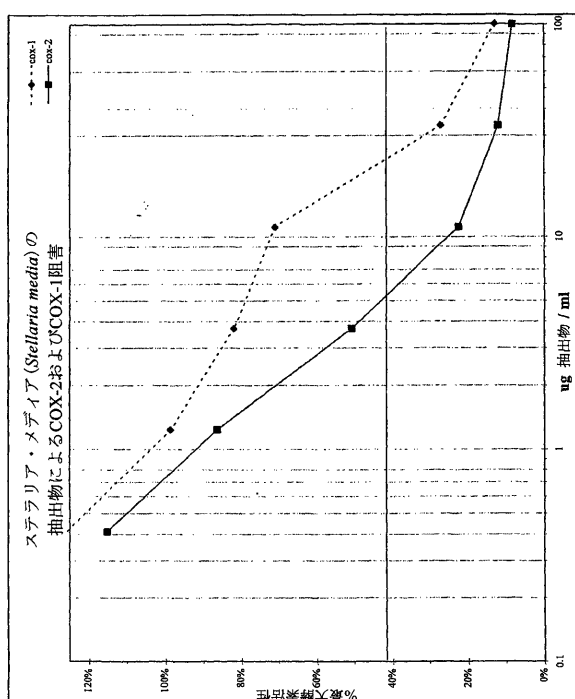
【図 18】



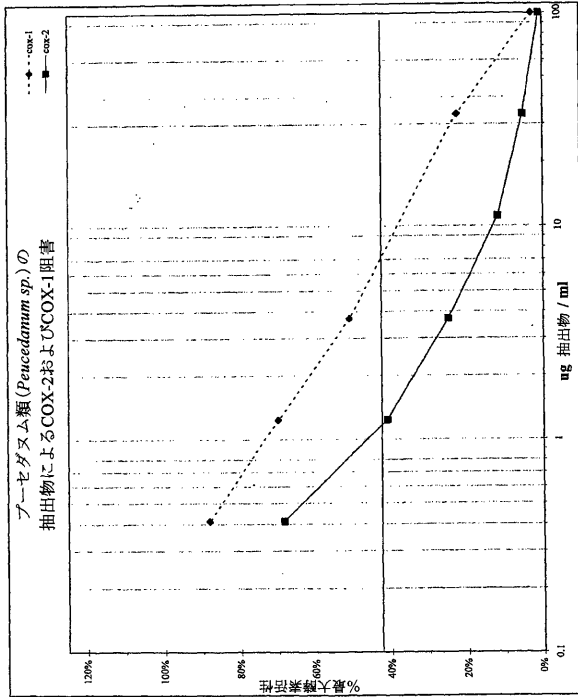
【図 19】



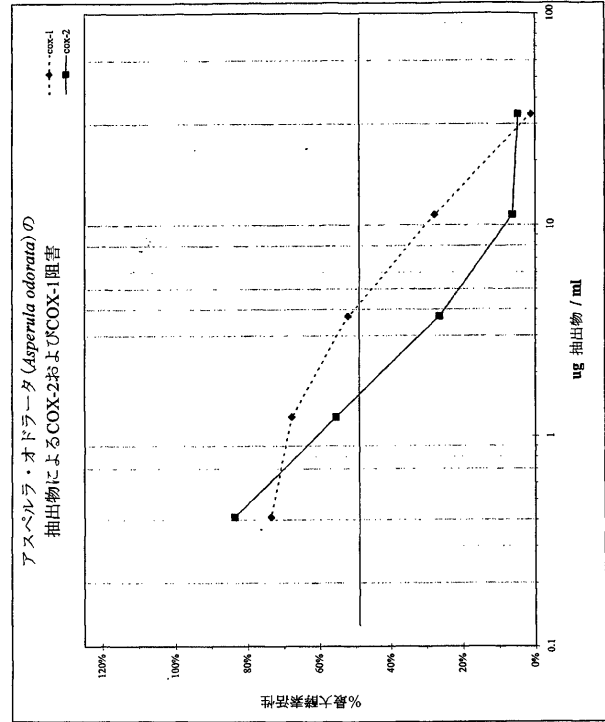
【図 20】



【図 2 1】



【図 2 2】



【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
20 June 2002 (20.06.2002)

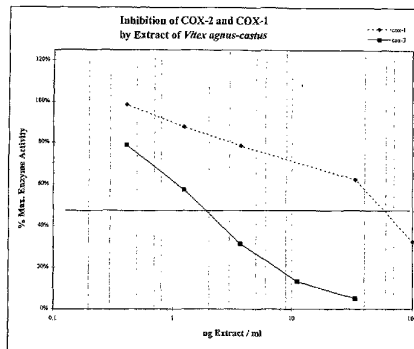
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/47708 A2

- (51) International Patent Classification: **A61K 35/78**,
A61P 29/00
- (21) International Application Number: PCT/US01/48912
- (22) International Filing Date:
13 December 2001 (13.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/737,892 15 December 2000 (15.12.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **PHARMACIA CORPORATION** [US/US]; Global Patent Department, 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **OBUKOWICZ, Mark, G.** [US/US]; 655 North Kirkwood Road, Kirkwood, MO 63122 (US); **HUMMERT, Susan, L.** [US/US]; 3447 St. Mark Lane, St. Ann, MO 63074 (US).
- (74) Agents: **DOTY, Kathryn, J.** et al.; Senniger, Powers, Leavitt & Roedel, One Metropolitan Square, 16th Floor, St. Louis, MO 63102 (US).
- (81) Designated States (national): 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, US, 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).

[Continued on next page]

(54) Title: SELECTIVE COX-2 INHIBITION FROM EDIBLE PLANT EXTRACTS



(57) Abstract: The present invention is directed toward a method for inhibiting COX-2 in an organism. In particular, the method is preferably directed toward selectively inhibiting COX-2 in an organism. The method comprises the step of administering to the organism an organic extract isolated from an edible plant wherein such extract inhibits COX-2. A method to purify a composition that exhibits COX-2 inhibition and COX-2 selective inhibition from the organic extract is also provided. In addition, a method for treating and/or preventing COX-2 mediated inflammation or inflammation-associated disorders in an organism is provided.

WO 02/47708 A2

WO 02/47708 A2**Published:**

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

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.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

1

SELECTIVE COX-2 INHIBITION FROM EDIBLE PLANT EXTRACTSField of the Invention

The current invention is generally directed toward nutraceuticals that are nonsteroidal anti-inflammatory agents capable of inhibiting cyclooxygenase-2 (COX-2). The present invention relates to a method for inhibition of COX-2, or selective inhibition of COX-2, in an organism by administering to the organism organic extracts isolated from edible plants wherein such extracts inhibit COX-2 activity. The present invention also relates to purified compositions of the edible plant organic extracts. In addition, the current invention is directed toward a method for treating and/or preventing COX-2 mediated inflammation or inflammation-associated disorders in an organism.

15 Background of the Invention

The prostaglandins are a potent class of biologically active lipid derivatives that play a crucial role in the inflammatory response. The inflammatory response is a localized tissue response to injury or other trauma characterized by pain, heat, redness and swelling. Prostaglandins mediate this response by inhibiting platelet aggregation, increasing vascular permeability, increasing vascular dilation, inducing smooth-muscle contraction and causing the induction of neutrophil chemotaxis. Because of their central role in mediating the inflammatory response, significant efforts have been directed toward elucidating compositions that are capable of inhibiting the biosynthesis of prostaglandins.

Toward that end, prostaglandin biosynthesis has been extensively characterized. Prostaglandins are a group of oxygenated fatty acids that are generally derived from arachidonic acid. The biosynthesis of prostaglandins from

WO 02/47708

PCT/US01/48912

2

arachidonic acid occurs in a three step process that includes 1) hydrolysis of arachidonic acid from phospholipid precursors catalyzed by a phospholipase A₂, 2) cyclooxygenase ("COX") catalyzed oxygenation of arachidonic acid to prostaglandin G₂ ("PGG₂"). This COX catalyzed reaction is the first committed and rate limiting step in prostaglandin synthesis; and 3) conversion of prostaglandin G₂ to the biologically active end product, prostaglandin, catalyzed by a series of synthases and reductases. Upon their synthesis, prostaglandins exit the cell and act in a hormone-like manner by effecting the target cell via G protein linked membrane receptors.

Inactivation of the COX enzyme is a natural target as a means to inhibit prostaglandin production due to this enzyme's pivotal role in the prostaglandin biosynthetic pathway. It is now known that two gene products possessing COX enzyme activity are expressed, termed COX-1 and COX-2. COX-1 was the first discovered isoform and is constitutively expressed in most tissue types. Because it is constitutively expressed, COX-1 is available to participate in activities requiring a rapid physiological response and causes the production of prostaglandins involved in "house-keeping" functions. For example, COX-1 is responsible for acute production of prostaglandins that regulate vascular homeostasis, maintain gastrointestinal integrity, and maintain kidney function. Thus, COX-1 activity is responsible for the synthesis of prostaglandins required for the maintenance of several cell types.

COX-2, on the other hand, is a recently discovered isoform that is inducibly expressed in response to numerous stimuli such as bacterial lipopolysaccharides, growth factors, cytokines, and phorbol esters. In addition, COX-2 is only expressed in a limited number of cell types including monocytes, macrophages, neutrophils, fibroblasts

WO 02/47708

PCT/US01/48912

3

and endothelial cells. COX-2 expression, unlike COX-1 expression, has been shown to increase in rheumatoid synovial tissue. Contrastingly, COX-2 expression is inhibited in response to glucocorticoids and by anti-inflammatory cytokines. Thus, based upon these observations, COX-2 has been shown to be the isoform responsible for mediating the production of prostaglandins that participate in the inflammatory response and inflammatory related disorders. In addition, COX-2 has also been shown to participate in certain cancers, Alzheimer's disease, atherosclerosis, and central nervous system damage resulting from stroke, ischemia and trauma.

Corticosteroids provide one means to reduce effects associated with the inflammatory response. These potent anti-inflammatory agents exert their effect by causing a reduction in the number and activity of immune system cells via various mechanisms. However, prolonged administration of corticosteroids results in drastic side effects that limit the therapeutic value of this class of anti-inflammatory agent.

Nonsteroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) are also utilized as a means to reduce effects associated with the inflammatory response. The principal pharmaceutical effects of NSAIDs are due to their ability to prevent COX activity resulting in the inhibition of prostaglandin synthesis. Inhibition of prostaglandin synthesis by NSAIDs is anti-pyretic, analgesic, anti-inflammatory, and anti-thrombogenic. However, administration of NSAIDs may also result in severe side effects such as gastrointestinal bleeding, ulcers and incidence of renal problems. NSAIDs also inhibit both COX isoforms to varying degrees. For example, the most common NSAID, aspirin (acetylated derivative of salicylic acid), inhibits prostaglandin biosynthesis by irreversibly inactivating both COX-1 and

WO 02/47708

PCT/US01/48912

4

COX-2 via acetylation of a serine residue located in the arachidonic acid binding domain. While aspirin inactivates both isoforms, it is 10 to 100 times more effective inactivating COX-1 as opposed to COX-2.

5 The selective inhibition of COX-2 has been shown to be anti-inflammatory and analgesic without the associated gastric and kidney related toxicity problems. This phenomenon is due to the discovery of NSAIDs that are capable of inhibiting COX-2, which is responsible for the
10 production of prostaglandins that mediate the inflammatory response, without causing the inhibition of COX-1, which is responsible for the production of prostaglandins that maintain both gastrointestinal integrity, and kidney function. Thus, the beneficial effects of NSAIDs are
15 separable from their drastic side effects by the development of COX-2 selective inhibitors.

Toward that end, several drugs that are COX-2 selective inhibitors of prostaglandin synthesis have been developed. The most extensively characterized class of COX-2 selective
20 inhibitor is diarylheterocycles, which include the recently approved drugs celecoxib and rofecoxib. However, other classes include, but are not limited to, acidic sulfonamides, indomethacin analogs, zomepirac analogs, and di-t-butylphenols. For example, U.S. Pat. No. 5,380,738
25 describes oxazoles which selectively inhibit COX-2, U.S. Pat. No. 5,344,991 describes cyclopentenones which selectively inhibit COX-2, U.S. Pat. No. 5,393,790 describes spiro compounds which selectively inhibit COX-2, WO94/15932 describes thiophene and furan derivatives which selectively
30 inhibit COX-2, and WO95/15316 describes pyrazolyl sulfonamide derivatives which selectively inhibit COX-2.

In order to afford an alternative to drug-based selective COX-2 therapy, it would be highly beneficial to provide nutraceuticals that inhibit COX-2, or even more

WO 02/47708

PCT/US01/48912

5

preferably selectively inhibit COX-2. A nutraceutical, in this context, is an edible food or extracts therefrom that exhibit COX-2 inhibitory activity. In particular, it would be highly beneficial to obtain such edible food or extract from a plant source due to the ability to derive a large quantity of edible food or extract from a plant at a relatively affordable cost. These nutraceutical agents could be utilized in the diet in a preventative manner to maintain a "healthy" physiological state. The nutraceutical agents could also be used as a means to treat, cure or mitigate an existing inflammatory-related ailment either alone or in combination with another compound as a part of combination therapy.

Summary of the Invention

Among the several aspects of the invention therefore, is provided a method for selective inhibition of COX-2 in an organism, the method comprising the step of administering to the organism a therapeutically or prophylactically effective amount of an organic extract of an edible plant, wherein the inhibitory effect of the extract on COX-2 activity is greater than or equal to about 2 times greater than the inhibitory effect of the extract on COX-1 activity.

Another aspect of the invention is a method for inhibiting the activity of COX-2 in an organism, the method comprising the step of administering to the organism a therapeutically or prophylactically effective amount of an organic extract of an edible plant, wherein the plant is selected from the order consisting of Agavales, Apocynales, Arales, Aristolochiales, Asterales, Brassicales, Cactales, Caryophyllales, Cucurbitales, Elaeagnales, Fagales, Gnetales, Graminales, Lamiales, Liliales, Malvales, Musales, Myrtales, Papaverales, Plantaginales, Polemoniales, Ranales,

WO 02/47708

PCT/US01/48912

6

Rosales, Rubiales, Rutales, Scrophulariales, Umbellales, Urticales, and Violales.

Still further is provided a method for selective inhibition of COX-2 in an organism, the method comprising
5 the step of administering to the organism a therapeutically or prophylactically effective amount of an organic extract of an edible plant, wherein the inhibitory effect of the extract on COX-2 activity is greater than or equal to about
2 times greater than the inhibitory effect of the extract on
10 COX-1 activity, wherein the organic extract is a purified composition obtained by a method comprising contacting the plant with an organic solvent to remove an extract from the plant wherein the extract inhibits COX-2 activity and then isolating the extract with COX-2 inhibitory activity.

15 In yet another aspect of the invention is provided a method of treating or preventing COX-2 mediated inflammation or an inflammation-associated disorder in an organism, the method comprising administering to the organism a therapeutically or prophylactically effective amount of a
20 purified composition of an organic extract isolated from an edible plant wherein the purified composition is obtained by a method comprising contacting the plant with an organic solvent to remove an extract from the plant wherein the extract inhibits COX-2 activity and then isolating the
25 extract with COX-2 inhibitory activity.

Other features of the present invention will be in part apparent to those skilled in the art and in part pointed out in the detailed description provided below.

Brief Description of the Drawings

30 These and other features, aspects, and advantages of the present invention will become better understood with regard to the following description, appended claims and accompanying figures where:

WO 02/47708

PCT/US01/48912

7

Figure 1 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Vitex agnus-castus*.

Figure 2 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Citrus limonia*.

5 **Figure 3** depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Citrus sp.*

Figure 4 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Papaver somniferum*

10 **Figure 5** depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Morus alba*

Figure 6 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Abutilon sp.*

Figure 7 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Coix lacryma*.

15 **Figure 8** depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Artemisia dracunculus*.

Figure 9 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Yucca elephantipes*.

20 **Figure 10** depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Rumex japonicus*.

Figure 11 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Dioscorea minutiflora*.

Figure 12 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Capsicum annum*.

25 **Figure 13** depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Cissampelos mucronata*.

Figure 14 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Cichorium endivia*.

30 **Figure 15** depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Aster sp.*

Figure 16 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Maranta arundinacea*.

Figure 17 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Cynomorium sangaricum*.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

8

Figure 18 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Solanum tuberosum*.

Figure 19 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Salvia sp.*

5 Figure 20 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Stellaria media*.

Figure 21 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Peucedanum sp.*

10 Figure 22 depicts COX-2 > COX-1 inhibition by extract isolated from *Asperula odorata*.

Abbreviations and Definitions

To facilitate understanding of the invention, a number of terms and abbreviations as used herein are defined below:

15 "Purified" means partially purified and/or completely purified. Thus, a "purified composition" may be either partially purified or completely purified.

"Extract" means crude extract, purified extract, and purified composition obtained by purification of the extract.

20 "COX activity" means the ability of either COX isoform, COX-1 or COX-2, to catalyze the oxygenation reaction of arachidonic acid to PGG₂.

"COX inhibitor or COX inhibition" means a composition, compound, agent or extract, purified or otherwise, that
25 prevents either COX isoform, COX-1 or COX-2, from catalyzing the oxygenation reaction of arachidonic acid to PGG₂ either in whole or in part.

"Selective inhibition of COX-2" means a composition, compound, agent, or extract, purified or otherwise, which
30 selectively inhibits COX-2 activity over COX-1 activity as determined by the ratio of the percentage of COX-2 inhibition divided by the percentage of COX-1 inhibition, unless otherwise indicated herein.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

9

"IC₅₀" means the concentration (in mol L⁻¹) that reduces a specified response to 50% of its former value. As used herein this value measures the amount of composition, agent or extract (ug extract/ml solvent) causing 50% inhibition of PGE2 production. The IC₅₀ value may be used to determine COX-2 selectivity as specifically set-forth herein.

"Plant or parts thereof" means either the whole plant, or any part of the plant such as an aerial part, fruit, leaf, stem, or root and any combination thereof.

10 "Order", as utilized herein, is a taxonomic category of related organisms with a category consisting of a number of similar families.

"Family", as utilized herein, is a taxonomic category of related organisms ranking below the order and above the genus.

15 "Species", as utilized herein, is a fundamental taxonomic category ranking below a genus and consisting of a group of closely related individuals.

COX = the enzyme cyclooxygenase

20 COX-1 = the isoform cyclooxygenase-1

COX-2 = the isoform cyclooxygenase-2

NSAIDs = non-steroidal anti-inflammatory drugs

PGE2 = prostaglandin E2

25 Description of the Preferred Embodiment

Applicants have discovered that organic extracts of certain edible plants or parts therefrom inhibit COX-2 activity. Applicants have also discovered that organic extracts of certain edible plants or parts therefrom selectively inhibit COX-2 activity. The inhibitory effect is selective because inhibition of COX-2 is greater than inhibition of COX-1. Consequently, organic extracts of the edible plants or parts therefrom may be used to selectively inhibit the activity of COX-2 in an organism without causing

WO 02/47708

PCT/US01/48912

10

an equivalent inhibition of COX-1 activity. Advantageously, these organic extracts are nutraceuticals that may be safely consumed and provide an alternative to traditional drug-based therapy for COX-2 inhibition.

5 Accordingly, the organic extracts of the present invention preferably inhibit COX-2 activity more than COX-1 activity. Preferably, the inhibitory effect of the plant extract on COX-2 is at least about two times greater than its inhibitory effect on COX-1. In a particularly preferred
10 embodiment, the inhibitory effect on COX-2 is at least about 10 times greater than the inhibitory effect on COX-1. COX enzyme inhibition and selectivity may be determined in accordance with any method generally known to those of ordinary skill in the field, as set forth in more detail
15 below.

 In addition to inhibiting COX-2, the organic extracts of the present invention are preferably isolated from an edible plant. As utilized herein, the term "edible" shall generally mean a substance consumed for the purpose of
20 nourishment consisting of protein, carbohydrate (fiber or otherwise), fat and/or combinations thereof used in the body of an organism to sustain growth, repair and vital processes and to furnish energy. Classification of plants as edible versus non-edible, in addition to this general definition,
25 is also based upon three primary criteria: (1) frequency of use as an edible substance; (2) availability in public commerce; and (3) toxicity limits due to potency. Therefore, the edible plant is preferably available to consumers in the region where the plant is provided in some
30 form by lawful commerce. In addition, the edible plant preferably has a history of use which demonstrates that it may be safely consumed on a daily basis in amounts commonly employed in the indigenous culture where the edible plant is found for nourishment purposes. For example, a particular

WO 02/47708

PCT/US01/48912

11

plant may be considered medicinal instead of edible if the plant is consumed by mouth for the purpose of correcting symptoms of illness (as opposed to nourishment) and is considered too potent to be consumed on a daily basis.

- 5 Examples of edible plant uses include, but are not limited to: sources of starch, fruits, vegetables, spices, condiments, edible oils from plants, food coloring and other food additives, beverages, teas and tonics, sugar and other natural sweeteners, fermented beverages, ferments and
- 10 enzymes, non-narcotic chewing leaves and gums, woody flavorings, and all other natural substances which are eaten or imbibed regularly to maintain health, sustain growth, repair injuries, and promote general well-being. In addition, any plant classified as edible by those of general
- 15 skill in the art is included in the scope of the present invention, for example, such references include, NAPRALERT; Tyozaburo Tanaka, (Edited by Sasuke Nakoa) Tanaka's Cyclopedia of Edible Plants of the World, Keigaku Publishing Co., Tokyo, Japan, 1976; Stephen Facciola, Cornucopia II: A
- 20 Source Book of Edible Plants, Kampong Publications, Vista, California, 1998; James A. Duke, Database of Phytochemical constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992; and George Macdonald Hocking, Dictionary of Natural Products, Plexus Publishing,
- 25 Inc., Medford, New Jersey, 1997. The contents of these references are hereby incorporated in their entirety.

In a particularly preferred embodiment, organic extracts are isolated from edible plants of the following plant orders: Agavales, Apocynales, Arales,

- 30 Aristolochiales, Asterales, Brassicales, Cactales, Caryophyllales, Cucurbitales, Elaeagnales, Fagales, Gnetales, Graminales, Lamiales, Liliales, Malvales, Musales, Myrtales, Papaverales, Plantaginales, Polemoniales, Ranales, Rosales, Rubiales, Rutales, Scrophulariales, Umbellales,

WO 02/47708

PCT/US01/48912

12

Urticales, and Violales. The ability of extracts isolated from edible plants of these particular orders to inhibit COX-2, to selectively inhibit COX-2, and their use as edible plants are set forth below in **Tables 1-24** and **Figures 1-22**.

5 It is to be understood that while applicant contemplates as within his invention the use of any organic extract isolated from edible plants wherein such extract inhibits COX-2 activity and preferably, wherein the inhibitory effect of such extract on COX-2 activity is
10 greater than or equal to about 2 times greater than the inhibitory effect of the extract on COX-1 activity, that also included within applicant's contemplation are the use of such class or classes, but excluding any particular member(s) (e.g., species, genus or order) which may be
15 previously disclosed and used and which inherently or otherwise possesses such required activity. For example, applicant's invention herein may include or exclude as appropriate, the full scope of the invention as related to *Atractylodes lancea* as set forth in applicant's U.S.
20 application ser. no. 09/272,363, which is fully incorporated herein by reference.

In order to prepare the organic extracts of the invention, an edible plant or parts thereof are preferably ground into a fine powder, the resultant powder is extracted
25 with a solvent, and the extraction solvent is removed from the extract. The whole plant may be used or parts of the plant including an aerial part, fruit, leaf, stem, or root and any combination thereof may be utilized. If desired, the resultant extract may be further purified to yield a
30 purified extract or one or more purified compositions. The grinding step may be accomplished by any commonly known method for grinding a plant substance. For example, the plant or parts thereof may be passed through a grinder to obtain a fine powder.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

13

After the plant or parts thereof have been ground into a fine powder, they are combined with an extraction solvent. The solution is then stirred at a temperature, and for a period of time, that is effective to obtain an extract with the desired inhibitory effects on the activity of COX-2. The solution is preferably not overheated, as this may result in degradation and/or denaturation of compounds in the extract. The solution may be stirred at a temperature between about room temperature (25° C) and the boiling point of the extraction solvent. Preferably, the solution is stirred at about room temperature.

The length of time during which the plant powder is exposed to the extraction solvent is not critical. Up to a point, the longer the plant powder is exposed to the extraction solvent, the greater is the amount of extract that may be recovered. Preferably, the solution is stirred for at least 1 minute, more preferably for at least 15 minutes, and most preferably for at least 60 minutes.

The extraction process of the present invention is desirably carried out using an organic solvent or a mixture of organic solvents. Organic solvents which may be used in the extraction process of the present invention, include but are not limited to hydrocarbon solvents, ether solvents, chlorinated solvents, acetone, ethyl acetate, butanol, ethanol, methanol, isopropyl alcohol and mixtures thereof. Hydrocarbon solvents which may be used in the present invention include heptane, hexane and pentane. Ether solvents which may be used in the present invention include diethyl ether. Chlorinated solvents which may be used in the present invention include dichloromethane and chloroform. Preferably, the solvent utilized for such extraction is a nonpolar organic solvent, such as dichloromethane or hexane.

The relative amount of solvent used in the extraction

WO 02/47708

PCT/US01/48912

14

process may vary considerably, depending upon the particular solvent employed. Typically, for each 100 grams of plant powder to be extracted, about 500 ml of extraction solvent would be used. The organic solvent may be removed from the
5 extract by any method known in the field of chemistry for removing organic solvents from a desired product, including, for example, rotary evaporation.

It is believed that the inhibitory effect of the plant extract of this invention on the activity of COX-2 is due to
10 the presence of one or more compounds in the extract. Compounds present in the extract which inhibit the activity of COX-2 may be isolated and purified by those of ordinary skill in the art employing methods known in the art. For example, column chromatography and fractional distillation
15 may be used to obtain pure compounds from the plant extract of this invention.

The isolation and purification of particular compounds from the organic plant extracts of this invention may be performed as described in Resch, et al., *J. Nat. Prod.*, 61,
20 347-350 (1998), the entire contents of which are incorporated by reference herein. The methods disclosed therein may be used to isolate and purify compositions which inhibit COX-2.

The ability of a particular organic extract to inhibit
25 COX-1 or COX-2 is preferably determined by performing COX activity assays utilizing recombinant COX-1 and COX-2. The COX-1 and COX-2 genes may be subcloned from a variety of organisms, however in a preferred embodiment such genes are isolated from human or murine sources, using a variety of
30 procedures known to those skilled in the art and detailed in, for example, Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) and Ausabel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd. ed., John Wiley & Sons (1995).

WO 02/47708

PCT/US01/48912

15

Additionally, the subcloned portion of the particular COX gene may be inserted into a vector by a variety of methods. In a preferred method, the sequence is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) in a

5 baculovirus transfer vector pVL1393 utilizing procedures known to those skilled in the art and detailed in, for example, Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) and Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular*
10 *Biology*, 3rd ed., John Wiley & Sons (1995).

The recombinant baculoviruses may be isolated by transfecting an appropriate amount of baculovirus transfer vector DNA into a sufficient quantity of SF9 insect cells along with linearized baculovirus plasmid DNA by the calcium
15 phosphate method or any other method generally known to those skilled in the art. (See M.D. Summers and G.E. Smith, *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*, Texas Agric. Exp. Station Bull. 1555 (1987)). Recombinant viruses may be purified by three
20 rounds of plaque purification and high titer (10^7 - 10^8 pfu/ml) stocks of virus may be prepared.

Preferably, for large scale production, cells may be infected in approximately 10 liter fermentors (0.5×10^6 /ml) with the recombinant virus stock such that the multiplicity
25 of infection is greater than about 0.1. After several hours the cells are centrifuged and the cell pellet is homogenized in an appropriate buffer such as Tris/sucrose (50 mM/25%, pH 8.0). The homogenate may then be centrifuged at an appropriate speed and for an appropriate time (such as
30 $10,000 \times G$ for 30 minutes) so as to cause the homogenate to separate into a pellet and supernatant fraction. The resultant supernatant fraction will contain the desired product and may be stored at $-80^\circ C$ until use.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

16

In order to test organic extracts for COX-2 inhibition and selectivity, standard COX-1 and COX-2 assays may be performed by employing ELISA procedures generally known to those skilled in the art. In such procedures, COX-1 and COX-2 activities are assayed as PGE₂ formed/ μ g protein/time using ELISA to detect the amount of PGE₂ synthesized from arachidonic acid. PGE₂ formation may be measured using PGE₂ specific antibody. Indomethacin, a non-selective COX-2/COX-1 inhibitor, may be employed as a positive control. The relative ability of various organic extracts to inhibit COX-1 or COX-2 at a particular concentration may be determined by comparing the IC₅₀ value expressed as μ g extract/ml solvent resulting in a 50% inhibition of PGE₂ production. Selective inhibition of COX-2 may then be determined by the IC₅₀ ratio of COX-1/COX-2. Additionally, any other means to determine COX inhibition known to those generally skilled in the art may be employed, for example, determining the ratio of percent inhibition of COX-1/COX-2 at a fixed concentration of test agent.

The extracts of this invention may be used to manage, prevent and/or treat an organism having, or at risk for developing, a condition which is mediated in whole or in part by COX-2. Accordingly, conditions which may be benefited by inhibition of COX-2 or selective inhibition of COX-2 include, but are not limited to, the treatment of inflammation in an organism, and for treatment of other inflammation-associated disorders, such as, an analgesic in the treatment of pain and headaches, or as an antipyretic for the treatment of fever. For example, extracts of the invention would be useful to treat arthritis, including but not limited to rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies, gouty arthritis, osteoarthritis, systemic lupus erythematosus and juvenile arthritis. Such extracts of the invention would be useful in the treatment of asthma,

WO 02/47708

PCT/US01/48912

17

bronchitis, menstrual cramps, tendinitis, bursitis, skin-related conditions such as psoriasis, eczema, burns and dermatitis, and from post-operative inflammation including ophthalmic surgery such as cataract surgery and refractive surgery. Extracts of the invention also would be useful to treat gastrointestinal conditions such as inflammatory bowel disease, Crohn's disease, gastritis, irritable bowel syndrome and ulcerative colitis, and treatment of cancer, including but not limited to the following types of cancer: colon, breast, prostate, bladder, or lung. In yet another preferred use, the extracts of the present invention may also be utilized as chemopreventive agents. Extracts of the invention would be useful in treating inflammation in such diseases as vascular diseases, migraine headaches, periarteritis nodosa, thyroiditis, aplastic anemia, Hodgkin's disease, scleroderma, rheumatic fever, type I diabetes, neuromuscular junction disease including myasthenia gravis, white matter disease including multiple sclerosis, sarcoidosis, nephrotic syndrome, Behcet's syndrome, polymyositis, gingivitis, nephritis, hypersensitivity, swelling occurring after injury, myocardial ischemia, and the like. The extracts would also be useful in the treatment of ophthalmic diseases, such as retinitis, retinopathies, uveitis, ocular photophobia, and of acute injury to the eye tissue. The extracts would also be useful in the treatment of pulmonary inflammation, such as that associated with viral infections and cystic fibrosis. Additionally, the extracts would be beneficial for the treatment of certain central nervous system disorders such as cortical dementias including Alzheimer's disease. The extracts of the invention are useful as anti-inflammatory agents, such as for the treatment of arthritis, with the additional benefit of having significantly less harmful side effects. These extracts

WO 02/47708

PCT/US01/48912

18

would also be beneficial in the treatment of allergic rhinitis, respiratory distress syndrome, endotoxin shock syndrome, atherosclerosis and central nervous system damage resulting from stroke, ischemia and trauma. Additionally, 5 the extracts would be useful in the treatment of pain, including but not limited to postoperative pain, dental pain, muscular pain, and pain resulting from cancer.

The present extracts may also be employed either alone or in combination with other compounds as a part of 10 combination therapy, partially or completely, in place of other conventional anti-inflammatories. For example, such as together with steroids, NSAIDs, 5-lipoxygenase inhibitors, leukotriene antagonists, LTA₄ hydrolase inhibitors, and LTC₄ synthase inhibitors. Preferably, with 15 combination therapy, one will typically combine a drug or drugs and a nutraceutical, such as a plant extract of the current invention, in a manner such that the drug and the nutraceutical have different mechanisms of action, but yet target the same disease. For example, in a typical 20 selection of agents for use in combination therapy to treat arthritis, one could utilize a plant extract of the present invention, which exhibits selective COX-2 inhibition with another agent known to attenuate inflammation associated with arthritis via an independent mechanism.

25 Those of ordinary skill in the art of preparing pharmaceutical formulations can readily formulate pharmaceutical compositions having plant extracts using known excipients (e.g., saline, glucose, starch, etc.). Similarly, those of ordinary skill in the art of preparing 30 nutritional formulations can readily formulate nutritional compositions having plant extracts. And those of ordinary skill in the art of preparing food or food ingredient formulations can readily formulate food compositions or food ingredient compositions having plant extracts.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

19

In addition, those of ordinary skill in the art can readily determine appropriate dosages that are necessary to achieve the desired therapeutic, prophylactic, pathologic or resuscitative effect upon oral, parenteral, rectal and
5 other administration forms to the organism. Typically, *in vivo* models (i.e., laboratory mammals) are used to determine the appropriate plasma concentrations necessary to achieve a desired mitigation of inflammation related conditions.

The extracts of the present invention may be employed
10 for the treatment and/or prevention of inflammation-related disorders, as identified above, in a number of organisms. Besides being useful for human treatment, these extracts are also useful for veterinary treatment of companion animals, exotic animals and farm animals, including mammals, rodents,
15 avians, and the like. More preferred animals include horses, dogs, cats, sheep, and pigs.

The detailed description set-forth above is provided to aid those skilled in the art in practicing the present invention. Even so, this detailed description should not be
20 construed to unduly limit the present invention as modifications and variation in the embodiments discussed herein can be made by those of ordinary skill in the art without departing from the spirit or scope of the present inventive discovery.

25 All publications, patents, patent applications and other references cited in this application are herein incorporated by reference in their entirety as if each individual publication, patent, patent application or other reference were specifically and individually indicated to be
30 incorporated by reference.

Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, using the preceding description, utilize the present invention to its fullest extent. The following preferred specific embodiments are, therefore, to

WO 02/47708

PCT/US01/48912

20

be construed as merely illustrative, and not limitative of the remainder of the disclosure in any way whatsoever.

Examples

Sample Preparation

5 Plants or parts thereof were dried and sliced ("sample"). Samples of organic extracts were prepared from the edible plants listed in **Table 1**. The plant orders and families that the various samples were prepared from are also set forth in **Table 1**. In addition, details regarding
10 the use of these plants as edibles is set-forth in **Table 2**. The particular sample was then ground into a fine powder using a coffee grinder. Approximately 100 grams of the resulting powder were added to approximately 500 ml of dichloromethane and stirred at room temperature for about 1
15 hour. The solvent was then removed by rotary evaporation, leaving several grams of the particular extract.

Inhibitory Effect of Various Plant Organic Extracts on COX-1 and COX-2 Activity

The particular extracts resulting from the sample
20 preparation procedure detailed above were each evaluated for selective inhibition of COX-1 and COX-2. The COX-1 and COX-2 inhibition activities were determined in vitro according to the method of Gierse et al., *J. Biochem.*, 305, 479-484 (1995). This method is summarized below.

25 Preparation of recombinant COX baculoviruses

Recombinant COX-1 was prepared by cloning a 2.0 kb fragment containing the coding region of human or murine COX-1 into a BamHI site of the baculovirus transfer vector pVL1393 (Invitrogen) to generate the baculovirus transfer
30 vectors for COX-1 according to the method of D.R. O'Reilly

WO 02/47708

PCT/US01/48912

21

et al., *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual* (1992).

Recombinant baculoviruses were then isolated by transfecting 4 µg of baculovirus transfer vector DNA into (2×10^8) SF9 insect cells along with 200 µg of linearized baculovirus plasmid DNA by the calcium phosphate method. (See M.D. Summers and G.E. Smith, *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*, Texas Agric. Exp. Station Bull. 1555 (1987)). Recombinant viruses were purified by three rounds of plaque purification and high titer (10^7 - 10^8 pfu/ml) stocks of virus were prepared.

For large scale production, SF9 insect cells were infected in 10 liter fermentors (0.5×10^6 /ml) with the recombinant baculovirus stock such that the multiplicity of infection was 0.1. After 72 hours the cells were centrifuged and the cell pellet was homogenized in Tris/sucrose (50 mM/25%, pH 8.0) containing 1% of 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS). The homogenate was then centrifuged at $10,000 \times G$ for 30 minutes, and the resultant supernatant was stored at $-80^\circ C$ until use.

Recombinant COX-2 was prepared by cloning a 2.0 kb fragment containing the coding region of human or murine COX-2 in accordance with the same method described above for COX-1.

Assay for COX-1 and COX-2 Activities

COX-1 and COX-2 activities were assayed as prostaglandin E2 (PGE2) formed/µg protein/time using ELISA to detect PGE2 synthesized from arachidonic acid. CHAPS-solubilized insect cell membranes containing recombinant COX-1 or COX-2 enzyme were incubated in a potassium phosphate buffer (50 mM, pH 8.0) containing epinephrine,

WO 02/47708

PCT/US01/48912

22

phenol, and heme. Compounds or extracts were pre-incubated with the appropriate enzyme for approximately 10-20 minutes. Arachidonic acid (10 M) was then added to the mixture and the reaction was permitted to occur for ten minutes at room temperature (25° C).

Any reaction between the arachidonic acid and the enzyme was stopped after ten minutes by transferring 40 ml of reaction mixture into 160 ml ELISA buffer and 25 M indomethacin. Indomethacin, a non-selective COX-2/COX-1 inhibitor, was utilized as a positive control. The PGE₂ formed was measured by standard ELISA technology utilizing a PGE₂ specific antibody (Cayman Chemical).

Approximately 200 mg of each extract obtained from the sample preparation procedure set-forth above were each individually dissolved in 2 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO) for bioassay testing to determine the COX-1 and COX-2 inhibitory effects of each particular extract. Potency was determined by the IC₅₀ value expressed as g extract/ml solvent resulting in a 50% inhibition of PGE₂ production. Selective inhibition of COX-2 was determined by the IC₅₀ ratio of COX-1/COX-2. The results of these bioassays performed utilizing extract isolated from the plant variety indicated are reported in **Tables 3-24** and **Figures 1-22** delineated below.

Table 1 below sets forth results of screening extracts of edible plants isolated from the orders, families, genera, and species indicated. A primary screen (indicated as 1' assay in Table 1) was performed in order to determine particular extracts that inhibit COX-2 at a concentration of 10 ug/ml. The extracts were then subjected to a confirmation assay to determine the extent of COX-2 inhibition at three different concentrations (10 ug/ml, 3.3 ug/ml and 1.1 ug/ml). The extracts were then tested for their ability to inhibit COX-1 at a concentration of 10

WO 02/47708

PCT/US01/48912

23

ug/ml. The percentage of COX inhibition compared to control is indicated as a percentage in each column, with a higher percentage indicating a greater degree of COX inhibition. In addition, the IC_{50} value for COX-1 and COX-2 was also
5 determined for certain extracts as indicated in Table 1. The selectivity for these extracts was then determined by the IC_{50} ratio of COX-1/COX-2, as set-forth above. The COX-2 selectivity of extracts whose IC_{50} value was not determined may be calculated by dividing the percentage of COX-2
10 inhibition (at a concentration of 10 ug/ml) by the percentage of COX-1 inhibition (at a concentration of 10 ug/ml).

[illegible]

Table 1 -Extracts from Edible Plants that Inhibit COX-2

Order	Family	Genus	Species	Common name	Part	1 st entry COX-2 18 µg/ml	Confirmatory assay COX-2 3.3 µg/ml	COX-2 10 µg/ml	COX-1 10 µg/ml	IC50 (µg/ml)	IC50 (µg/ml) COX-1	Selectivity COX-2/COX-1
Rosales	Rubiaceae	<i>Albizia</i>	<i>albiflora</i>	morango (Africa)	leaf	27%	49%	27%	9%	***	***	***
Rosales	Faboaceae	<i>Phaseolus</i>	<i>max.</i>	soybean	seed	76%	89%	83%	52%	***	***	***
Rosales	Faboaceae	<i>Phaseolus</i>	<i>vulgaris var. Peruvian</i>	Peruvian bean	seed	82%	97%	42%	13%	***	***	***
Rosales	Faboaceae	<i>Phaseolus</i>	<i>radiatus</i>	cowpea	seed	76%	92%	78%	34%	***	***	***
Rosales	Faboaceae	<i>Phaseolus</i>	<i>multiculis</i>	long bean	seed	78%	92%	83%	32%	***	***	***
Rosales	Faboaceae	<i>Phaseolus</i>	<i>unipetiolatus</i>	long bean	seed	78%	92%	83%	32%	***	***	***
Rubiaceae	Rubiaceae	<i>Antennaria</i>	<i>odorata</i>	wildflower	leaf	87%	99%	53%	72%	***	***	***
Rubiaceae	Valerianaceae	<i>Valeriana</i>	<i>officinalis</i>	valerian root	leaf	82%	100%	99%	57%	***	***	***
Rubiaceae	Citrus	<i>limonia</i>	<i>limonia</i>	lime	fruit	84%	83%	***	7%	***	***	***
Rubiaceae	Citrus	<i>aurantifolia</i>	<i>aurantifolia</i>	orange	fruit	82%	93%	***	11%	***	***	***
Rubiaceae	Artemisiaceae	<i>Artemisia</i>	<i>arbuscula</i>	dog fennel	leaf	76%	89%	83%	11%	***	***	***
Rubiaceae	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>angelica</i>	angelica (Europe)	leaf	76%	89%	83%	11%	***	***	***
Rubiaceae	Umbelliferae	<i>Umbelliferae</i>	<i>carvi</i>	black caraway	fruit	52%	87%	87%	47%	***	***	***
Rubiaceae	Asteraceae	<i>Achillea</i>	<i>achillea</i>	cow kola	leaf	73%	69%	88%	19%	***	***	***
Rubiaceae	Umbelliferae	<i>Umbelliferae</i>	<i>foeniculum</i>	oxycole umbellifer	seed	50%	82%	62%	46%	***	***	***
Rubiaceae	Umbelliferae	<i>Umbelliferae</i>	<i>unidentif.</i>	unidentified	seed	78%	100%	***	33%	***	***	***
Rubiaceae	Umbelliferae	<i>Umbelliferae</i>	<i>alba</i>	fructus m. g. g. g. g. g.	fruit	80%	88%	***	0.9	***	***	***
Rubiaceae	Umbelliferae	<i>Umbelliferae</i>	<i>elata</i>	klavus; pakem	seed	80%	91%	90%	5%	***	***	***
Rubiaceae	Umbelliferae	<i>Umbelliferae</i>	<i>edulis</i>	passion flower	fruit	86%	86%	95%	20%	***	***	***
Rubiaceae	Umbelliferae	<i>Umbelliferae</i>	<i>pasiflora</i>	passion flower	fruit	86%	65%	45%	23%	***	***	***

* Primary screen performed at three concentrations. Samples were not repeated in a COX-2 confirmation assay.

— No data due to assay error.
— Not tested.

700557 1041

Brassicales also classified as Sapindales or Rutales

Brassicaceae also classified as Cruciferae

Poaceae also classified as Graminae

Lamiaceae also classified as Labiales

Apiaceae also classified as Umbelliferae

Boerhaavia also classified as Cordiaceae or Erythriaceae

Pandanus also classified as *Acrales* or *Alismatoidae*

Balanophoraceae also classified as Coniophoraceae

WO 02/47708

PCT/US01/48912

27

The order, family, genus, and species of each plant whose extract was tested for COX-2 and COX-1 inhibitory activities are shown.

Table 2 below provides a description detailing the particular edible use of each plant extract tested for COX-2 inhibition as set-forth in **Table 1**. The plants are listed alphabetically according to genus. In addition, a comprehensive listing of references known to those generally skilled in the art is provided that details the edible consumption of these plants.

Table 2 - Edible Uses of Plant Extracts

Index	Scientific Name	Common Name	Isolate/ Chemical ID	Sample ID	Extraction #	Reference
140	<i>Abutilon</i> unidentified	Mallows. Seeds edible.	78916	91448 5		
96	<i>Acacia sieberiana</i>	muwunga (African)	78486	91413 4		2
5	Yields a clear gum of good quality. Used like gum Arabic as bulking agent.					
11	<i>Acanthus arboreus</i>	otagalo	78487	91413 5		1,2
	Leaves are a masticatory.					
17	<i>Acorus calamus</i>	calamus root	80328	92270 1		1,2,3, 4
10	Rootstock made into candy. Also used as flavoring for alcoholic drinks.					
18	<i>Acorus gramineus</i>	Shih-chang	79050	9146 19		2
	Rhizome is eaten.					
129	<i>Albizia julibrissin</i>	mimosa	76892	91233 4		2
15	Young leaves are eaten after being boiled down.					
130	<i>Allium schoenoprasum</i>	Chinese chives	78569	91413 8		1,2,3, 4
	Leaves eaten in salads, soups and omelets.					
229	<i>Allium unidentified</i>	Many species edible.	79513	91484 7		
9	<i>Alternanthera pungens</i>	burweed	78470	91411 9		1,2
20	Young leaves are eaten.					
10	<i>Angelica sinensis</i>	angelica, Dong quai tea	79771	92260 5		3
	Roots eaten in soups.					
31	<i>Aristolochia unidentified</i>	Leaves of contorta and debilis eaten boiled	79611	91494 5		
32	<i>Aristolochia unidentified</i>	Leaves of contorta and debilis eaten boiled	79611	91590 5		
25	35 <i>Artemisia dracunculus</i>	tarragon	78683	91425 2		3
	Leaves eaten baked or in salads.					
34	<i>Asclepias tuberosa</i>	pleurisy root	80399	92277 2		1,2,3
	Pods when boiled are eaten; tender shoots are eaten as greens. Roots are consumed boiled					
30	185 <i>Asperula odorata</i>	woodruff	80436	92280 9		1,2,3

WO 02/47708

PCT/US01/48912

29

This plant is used for flavoring a beverage.					
37	Aster unidentified	Young leaves of many species eaten.	78941	914510	
75	Blumea alata	Leaves of other species eaten.	78477	914125	
63	Brassica rapa	Choy sum	78573	914142	1,2,3,4
57	Brassica rapa	turnip	78567	914136	1,2,4
Roots are eaten fresh, grated, cooked, put in soup or pickled. Leaves are eaten.					
65	Capparis spinosa	Caper berries	79419	914753	1,2,3,4
Flower buds are eaten pickled.					
58	Capsella bursa-pastoris	shepherd's purse	80400	922773	1,2,3
The plant is used as a vegetable.					
206	Capsicum annuum	pepper	79789	922623	1,2,3,4
207	Capsicum annuum	pepper	78583	914152	1,2,3,4
212	Capsicum annuum	Pasilla Chile pepper	78624	914193	1,2,3,4
Pods and young leaves are edible.					
208	Capsicum chinense	Chinese pepper	78581	914150	6
The fruits are edible.					
12	Carum carvi	black caraway	78630	914199	1,2,3,4
Young shoots and leaves can be eaten. Seeds are used for flavoring.					
254	Castanea sativa	Spanish chestnut	78865	914434	1,2,3,4
Fruits of most species edible					
13	Centella asiatica	gotu kola	78454	914103	1,2,3,4
The herb is eaten as a salad, also cooked in some countries.					
38	Cichorium endivia	endive	78703	914272	3
Leaves for salad or as a boiled vegetable.					
142	Cissampelos mucronata	jenjoko, mugulita	78485	914133	1,3
Cited for food use in NAPRALERT with no details.					
77	Citrullus vulgaris	watermelon	79763	922597	2
Fruits are eaten ripe. Seeds are parched and eaten.					
195	Citrus limonia	lime	78593	914162	3

WO 02/47708

PCT/US01/48912

30

The juice is used to add sour taste to foods. Also used in beverages.						
196	Citrus unidentified	Fruits of most are edible (oranges, limes, lemons, etc.)	77669	91249	6	
163	Coix lacryma-jobi	Job's tears	80461	92283	4	1,2,3
5 Seeds are used as tea in Japan, Vietnam, etc. They are eaten as cereals in porridge, soups or pastries						
22	Colocasia esculenta	Malanga coco	78076	91291	8	1,2,3,4
23	Colocasia esculenta	Dried taro stem	79794	92262	8	1,2,3,4
10 The tubers are eaten boiled, fried, steamed, put in soup (essential in New Year ceremonial miso-soup in W. Honshu), pounded into dumplings or employed as a starch resource. Young leaves and leaf stalks are eaten as vegetable or sun-dried for later use.						
86	Cordia tetrandra	Species not found, but the fruits of a number of species of this genus are edible.	77182	91245	5	
39	Crassocephalum mannii	Possibly Gynura mannii. Species not found, but leaves of other species edible.	78469	91411	8	
15	82 Cynomorium sangaricum	Species not found. Other species are condiments.	79013	91458	2	
83	Dioscorea minutiflora	bush yam	78483	91413	1	6
Tubers (tubercules) are edible.						
84	Dioscorea unidentified	Yams. Most tubers edible	79323	91465	7	
249	Elaeagnus umbellata	Silver berries	76938	91236	5	5
20 Fruits edible scalded.						
167	Eleusine coracana	Sweet Indian millet	79796	92263	0	1,2,3,4
Cereal grain eaten.						
14	Eryngium foetidum	coyote culantro; fitweed	78570	91413	9	1,2,3,4

WO 02/47708

PCT/US01/48912

31

Roots as condiment in soups and meat dishes they impart a very agreeable flavor. Young leaves are eaten raw, steamed or cooked with rice					
117	Ginkgo biloba	ginko nuts	78610	91417	3
Seeds (nuts) are edible roasted or dried.					
111	Glycine max	Soy bean	78995	91456	1,2,3,4
Bean is eaten.					
164	Hordeum distichon	barley	80506	92287	5
Cereal grain edible. Used in making beer.					
64	Hylocereus undatus	Pitahaya	78839	91440	2
Fruit is edible.					
76	Ipomoea aquatica	water spinach	78608	91417	1,2,3,4
Leaves and young, tubular stems are used as vegetable.					
134	Lilium unidentified	Lilies. Bulbs of many species edible.	79331	91466	
120	Lycopus lucidus	Herba Lycopi	79514	91484	2
Roots eaten boiled or in soup.					
141	Maranta arundinacea	arrowroot	78867	91443	3
Tubers are eaten raw, roasted, grated into a coarse meal or made into arrowroot powder.					
145	Morus alba	Fructus Mori	79019	91458	2,4
Fruits are edible (mulberry).					
78	Mukia maderaspatana	Alternate name is Cucumis maderaspatana. These are cucumbers. Most related species have edible fruit.	78458	91410	
147	Musa paradisiaca	Banana blossom	78578	91414	1,2,3
Fruit and blossoms are edible.					
121	Ocimum basilicum	Herba Ocimi	78971	91454	1,3,4
Basil is used as a flavoring.					
152	Oenothera biennis	primrose flowers	80412	92278	1,2,3
Roots and the shoot are eaten; the latter is consumed as salad.					
165	Oryza sativa	rice, many varieties	79428	91476	1,2,3,4
166	Oryza sativa var.	Sticky sweet	79796	92263	1,2,3,4

WO 02/47708

PCT/US01/48912

32

	sticky sweet	rice		0		
	It is boiled or steamed usually, though some nations often cook it with other vegetable or put in soups. It is also made into cakes, pastries, puddings and starch, and also fermented into intoxicating beverages, vinegar and miso.					
35	228Pangium edule	peeled kluwak nut	79314	91464	8	2
	154Papaver somniferum	poppy	78646	91421	5	1,2,3,4
	155Papaver somniferum	poppy	78612	91418	1	1,2,3,4
	156Papaver somniferum	poppy	80445	92281	8	
40	Opium, one of the famous narcotics, is obtained from the milky juice of the capsule. In India, beverages are prepared from it. Nursery plant is eaten as vegetable in China. Seeds are used in sweetmeats, bakery food, confectionary, curries and the manufacture of an edible oil.					
	157Passiflora edulis	Passion flower	79382	91471	6	1,2,3
45	Fruit is edible.					
	122Perilla frutescens	Folium Perillae	78955	91452	4	5
	Oil used in oriental cooking. Leaves are a flavoring.					
	227Peucedanum unidentified	Most species are medicinal, but leaves and tubers of some species edible.	78939	91450	8	
	107Phaseolus vulgaris var. Peruvian	Peruvian bean	79398	91473	2	1,2,3,4
50	Seeds and pods are edible.					
	158Phytolacca americana	pokeweed	80393	92276	6	1,2,3,4
	Young shoots are eaten as potherb. Fruit was used to color wine and confectionaries.					
	162Plantago psyllium	psyllium seed	80408	92278	1	3
55	Sprouted seeds eaten in salads. Seeds yield nutritional oil. Seed husk mucilage used as thickener.					
	268Polygonum aviculare	Michi-yanagi	76896	91233	6	2,3,4
	Leaves edible.					
	269Polygonum caespitosum	Hana-tade	76928	91235	8	5
60	Edible in soups					
	170Polygonum odoratum	knotweed, smartweed	78837	91440	6	1,2,3
	A condiment for fish and meat.					
	232Polygonum unidentified	Many species edible.	79569	9149	03	

WO 02/47708

PCT/US01/48912

33

123	<i>Prunella vulgaris</i>	Spica prunellae	79018	914587		1,2,3,4
Cold-water infusion of the plant is a beverage						
173	<i>Rumex japonicus</i>	Japanese dock	76821	912284		1,2,3
5	Leaves are eaten boiled, in soups or dried for later use. Seeds are mixed with rice or ground into flour for making into dumplings.					
124	<i>Salvia unidentified</i>	Sages. Whole plant edible in most species.	79492	914826		
43	<i>Silybum marianum</i>	milk thistle tea	79480	914814		1,2,3,4
10	Young shoots are boiled and eaten in spring. Seeds are roasted into a coffee substitute.					
136	<i>Smilax ornata</i>	sarsaparilla	80404	922777		6
Used as a flavoring for beverages.						
214	<i>Solanum melongena</i>	eggplant	78835	914404		1,2,3,4
15	Fruit is cooked, put in soup, eaten raw with rice, stewed, fried, or-roasted, baked or pickled. One of the favorite culinary vegetables in the Far East. Leaves are mixed with the rice bran and salt.					
215	<i>Solanum tuberosum</i>	potato	79653	914987		1,2,3,4
216	<i>Solanum tuberosum</i>	potato	79654	914988		1,2,3,4
20	217	<i>Solanum tuberosum</i>	potato	79651	914985	1,2,3,4
Tubers are eaten in salad when raw. They are eaten cooked, steamed, fried, mashed, otherwise prepared into various dishes. They are an important staple food in many countries, also the essential source of starch and alcohol.						
25	44	<i>Sonchus oleraceus</i>	chicory	78466	914115	1,2,3,4
Young leaves are eaten raw or parboiled and then cooked.						
68	<i>Stellaria media</i>	chickweed	76809	912274		3
69	<i>Stellaria media</i>	chickweed	79762	922596		3
Young parts are used as boiled vegetable in time of scarcity.						
30	230	<i>Sterculia lychnophora</i>	Luoi uoi	78838	914407	2
Seeds are made into a beverage.						
47	<i>Taraxacum mongolicum</i>	Mansen-tanpopo	79523	914857		2.4
Leave eaten as boiled vegetable						
46	<i>Taraxacum officinale</i>	dandelion	79478	914812		1,2,3,4
35	Leaves are used in salads; sometimes bleached. Source of Dandelion wine. Roots are eaten raw, boiled or in lieu of coffee.					

PCT/US01/48912

110	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	fennugreek seed	78605	91417	4	1,2,3,4
Seeds are used to adulterate coffee, also for spice. Leaves and pods are used as vegetable.						
137	<i>Trillium erectum</i>	bethroot	79018	91458	7	1,2,3,4
5	Young leaves are eaten in salads and as a potherb.					
225	<i>Ulmus rubra</i>	slippery elm bark tea	79479	91481	3	3
Powdered bark is edible. Sweet mucilaginous inner bark is chewed						
236	<i>Valeriana officinalis</i>	Valerian root	79365	91469	9	1,3,4
Root used to flavor ice cream, etc. Also used as an						
10	herbal tea.					
112	<i>Vigna umbellata</i>	red bean	78604	91417	3	1,3
Young leaves and pods eaten steamed. Dried seed boiled and eaten with rice and soups.						
113	<i>Vigna unguiculata</i>	long bean	78580	91414	9	1,2,3,4
15	Seeds are edible steamed, boiled or stir-fried. Dried seeds used in soups.					
273	<i>Vitex agnus-castus</i>	Chaste lamb	79481	91481	5	4
Fruits of most species edible.						
26	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>	Malanga	78574	91414	3	1,2,3,4
20	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>	Malanga	78575	91414	4	1,2,3,4
Tubers are eaten like taro.						
4	<i>Yucca elephantipes</i>	Spanish dagger; izote	77717	91250	4	3
Flowers and young stem tips are edible.						
169	<i>Zea mays</i>	corn	79625	91495	9	1,2,3,4
25	Major cereal crop.					

WO 02/47708

PCT/US01/48912

35

References

1. **NAPRALERT** (NATural Products ALERT), which currently contains the extracted information from over 116,000 scientific research articles and books from 1650 A.D. to the present. The **NAPRALERT** database is housed and maintained by the Program for Collaborative Research in the Pharmaceutical Sciences (PCRPS), within the Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, in the College of Pharmacy of the University of Illinois at Chicago, 833 South Wood Street (M/C 877), Chicago, IL 60612, U.S.A.
2. Tyozaburo Tanaka, (Edited by Sasuke Nakao) **Tanaka's Cyclopedia of Edible Plants of the World**, Keigaku Publishing Co., Tokyo, Japan, 1976.

This is a compendium of about 11,000 species of plants, including the essential wild species of the world. This book is considered to be one of the principle references on the world's edible plants.
3. Stephen Facciola, **Cornucopia II: A Source Book of Edible Plants**, Kampong Publications, Vista, California, 1998.

This book records the more than 3,000 species available in the U.S. and abroad.
4. James A. Duke, **Database of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992.

A database of approximately 1000 plants and 3000 compounds.
5. George Macdonald Hocking, **Dictionary of Natural Products**, , Plexus Publishing, Inc., Medford, NJ, 1997.

"Terms in the field of Pharmacognosy relating to natural medicinal and pharmaceutical materials and the plants, animals and minerals from which they are derived." The work contains over 18,000 entries.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

36

6. Enrique Sanchez-Monge, *Flora Agricola: Taxonomía de las Magnoliófitas (Angiospermas) de interés agrícola, con excepción de las de aprovechamiento exclusivamente ornamental o forestal*, Ministerio de Agriculture, Pesca y Alimentación, Madrid, Spain, (date unknown).

An excellent reference work in Spanish with descriptions of plants, common names in many languages and commercial use of agricultural organisms of the world

7. Anthony R. Torkelson, *The Cross Name Index to Medicinal Plants, Volumes I - IV*, CRC Press, Boca Raton, FL, (1998-1999).

8. Umberto Quattrocchi, *CRC World Dictionary of Plant Names: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology* (Volumes 1-4), CRC Press, Boca Raton, FL (2000).

9. W³TROPICOS, a web site providing access to the Missouri Botanical Garden's VAST (VAscular Tropicos) nomenclatural database and associated authority files.

10. *Webster's Ninth New Collegiate Dictionary*, Merriam-Webster Inc., Springfield, Massachusetts, (1983).

Tables 3-24 further illustrate the ability of certain extracts isolated from the families identified in Table 1 to selectively inhibit COX-2. A total of six different concentrations of the various extracts were tested for their ability to inhibit both COX-1 and COX-2. The IC₅₀ value for COX-1 and COX-2 was also determined and a selectivity ratio was then calculated as set forth above. Figures 1-22 are graphs that depict the data shown in Tables 3-24 as indicated.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

37

Table 3 - Extract isolated from *Vitex agnus-castus*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	33%	Not determined
33.3	62%	5%
11.1	Note determined	13%
3.70	78%	31%
1.23	88%	57%
0.41	98%	79%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
50	1.5	33.3

Table 4 - Extract isolated from *Citrus limonia*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	19%	Not determined
33.3	52%	Not determined
11.1	70%	Not determined
3.70	79%	22%
1.23	92%	51%
0.41	98%	69%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
35	1.5	23.3

WO 02/47708

PCT/US01/48912

38

Table 5 - Extract isolated from *Citrus sp.*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	16%	4%
33.3	37%	4%
11.1	Not determined	7%
3.70	67%	16%
1.23	80%	35%
0.41	88%	64%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
15	0.7	21.4

Table 6 - Extract isolated from *Papaver somniferum*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	26%	Not determined
33.3	46%	Not determined
11.1	65%	5%
3.70	67%	26%
1.23	81%	55%
0.41	88%	72%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
30	1.5	20.0

WO 02/47708

PCT/US01/48912

39

Table 7 - Extract isolated from *Morus alba*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	33%	5%
33.3	45%	9%
11.1	Not determined	9%
3.70	68%	20%
1.23	80%	44%
0.41	103%	71%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
20	1	20.0

Table 8 - Extract isolated from *Abutilon sp.*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	23%	Not determined
33.3	44%	5%
11.1	74%	7%
3.70	76%	35%
1.23	89%	54%
0.41	113%	82%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
28	1.5	18.7

WO 02/47708

PCT/US01/48912

40

Table 9 - Extract isolated from *Coix lacryma*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	14%	Not determined
33.3	51%	5%
11.1	Not determined	11%
3.70	100%	39%
1.23	95%	59%
0.41	105%	80%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
35	2	17.5

Table 10 - Extract isolated from *Artemisia dracuncululus*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	27%	Not determined
33.3	41%	1%
11.1	66%	5%
3.70	81%	23%
1.23	82%	51%
0.41	90%	75%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
22	1.5	14.7

WO 02/47708

PCT/US01/48912

41

Table 11 - Extract isolated from *Yucca elephantipes*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	4%	Not determined
33.3	28%	3%
11.1	Not determined	11%
3.70	66%	32%
1.23	79%	56%
0.41	105%	80%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
10	0.7	14.3

Table 12 - Extract isolated from *Rumex japonicus*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	10%	1%
33.3	30%	3%
11.1	Not determined	5%
3.70	63%	15%
1.23	72%	35%
0.41	88%	62%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
9	0.65	13.8

WO 02/47708

PCT/US01/48912

42

Table 13 - Extract isolated from *Dioscorea minutilora*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	Not determined	Not determined
33.3	18%	Not determined
11.1	69%	Not determined
3.70	90%	24%
1.23	95%	50%
0.41	109%	70%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
18	1.5	12.0

Table 14 - Extract isolated from *Capsicum annuum*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	16%	7%
33.3	26%	9%
11.1	41%	11%
3.70	72%	18%
1.23	99%	38%
0.41	112%	65%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
8	0.75	10.7

WO 02/47708

PCT/US01/48912

43

Table 15 - Extract isolated from *Cissampelos mucronata*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	9%	Not determined
33.3	35%	Not determined
11.1	58%	8%
3.70	72%	34%
1.23	83%	58%
0.41	98%	83%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
18	1.8	10.0

Table 16 - Extract isolated from *Cichorium endivia*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	9%	2%
33.3	51%	8%
11.1	Not determined	27%
3.70	93%	46%
1.23	98%	78%
0.41	104%	98%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
35	3.5	10.0

WO 02/47708

PCT/US01/48912

44

Table 17 - Extract isolated from *Aster sp.*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	Not determined	Not determined
33.3	17%	Not determined
11.1	Not determined	1%
3.70	66%	23%
1.23	78%	40%
0.41	90%	69%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
7.5	0.8	9.4

Table 18 - Extract isolated from *Maranta arundinacea*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	Not determined	Not determined
33.3	7%	Not determined
11.1	26%	Not determined
3.70	57%	10%
1.23	65%	34%
0.41	82%	60%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
5	0.65	7.7

WO 02/47708

PCT/US01/48912

45

Table 19 - Extract isolated from *Cynomorium sangaricum*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	7%	Not determined
33.3	31%	Not determined
11.1	57%	3%
3.70	75%	37%
1.23	74%	57%
0.41	84%	75%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
15	2	7.5

Table 20 - Extract isolated from *Solanum tuberosum*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	13%	7%
33.3	27%	14%
11.1	50%	19%
3.70	82%	31%
1.23	96%	62%
0.41	102%	86%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
12	2	6.0

WO 02/47708

PCT/US01/48912

46

Table 21 - Extract isolated from *Salvia sp.*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	15%	8%
33.3	27%	10%
11.1	64%	22%
3.70	85%	47%
1.23	95%	80%
0.41	107%	88%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
18	3.5	5.1

Table 22 - Extract isolated from *Stellaria media*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	13%	8%
33.3	27%	12%
11.1	71%	23%
3.70	82%	51%
1.23	99%	86%
0.41	126%	115%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
20	4	5.0

WO 02/47708

PCT/US01/48912

47

Table 23 - Extract isolated from *Peucedanum sp.*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	3%	1%
33.3	23%	5%
11.1	Not determined	12%
3.70	51%	25%
1.23	70%	41%
0.41	88%	69%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
4	0.9	4.4

Table 24 - Extract isolated from *Asperula odorata*

Amount of Extract (ug/ml)	COX-1 Activity Relative to Control	COX-2 Activity Relative to Control
100	Not determined	Not determined
33.3	1%	5%
11.1	28%	6%
3.70	52%	26%
1.23	68%	55%
0.41	74%	84%

IC ₅₀ (ug/ml) COX-1	IC ₅₀ (ug/ml) COX-2	COX-2 Selectivity Ratio
4	1.5	2.7

WO 02/47708

PCT/US01/48912

48

As illustrated by these data, the organic extracts isolated from the indicated edible plant inhibit COX-2. In fact, several of the extracts selectively inhibit COX-2 over COX-1 by greater than 10-
5 fold. In view of the above, it will be seen that the several objectives of the invention are achieved and other advantageous results attained.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

49

Claims

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for selective inhibition of COX-2 in an organism, the method comprising the step of administering to
5 the organism a composition comprising a therapeutically or prophylactically effective amount of an organic extract of an edible plant, wherein the inhibitory effect of the extract on COX-2 activity is greater than or equal to about 2 times greater than the inhibitory effect of the extract on
10 COX-1 activity.

2. The method of claim 1 wherein the COX-2 activity is greater than or equal to about 10 times greater than the inhibitory effect of the extract on COX-1 activity.

3. A method for inhibiting the activity of COX-2 in an organism, the method comprising the step of administering to the organism a composition comprising a therapeutically or prophylactically effective amount of an organic extract
5 of an edible plant, wherein the plant is selected from the orders consisting of Agavales, Apocynales, Arales, Aristolochiales, Asterales, Brassicales, Cactales, Caryophyllales, Cucurbitales, Elaeagnales, Fagales, Gnetales, Graminales, Lamiales, Liliales, Malvales, Musales,
10 Myrtales, Papaverales, Plantaginales, Polemoniales, Ranales, Rosales, Rubiales, Rutales, Scrophulariales, Umbellales, Urticales, and Violales.

4. The method of claim 3 wherein the inhibitory effect of the extract on COX-2 activity is greater than or equal to about 2 times greater than the inhibitory effect of the extract on COX-1 activity.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

50

5. The method of claim 3 wherein the inhibitory effect of the extract on COX-2 activity is greater than or equal to about 10 times greater than the inhibitory effect of the extract on COX-1 activity.

6. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Agavales order is selected from the plant family Agavaceae.

7. The method of claim 6 wherein the organic extract of the Agavaceae family is from the genus Yucca.

8. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Apocynales order is selected from the plant family Asclepiadaceae.

9. The method of claim 8 wherein the organic extract of the Asclepiadaceae family is from the genus Asclepias.

10. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Arales order is selected from the plant family Araceae.

11. The method of claim 10 wherein the organic extract of the Araceae family is selected from the genera consisting of Acorus, Colocasia, and Xanthosoma.

12. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Aristolochiales order is selected from the plant family Aristolochiaceae.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

51

13. The method of claim 12 wherein the organic extract of the Aristolochiaceae family is from the genus *Aristolochia*.

14. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Asterales order is selected from the plant family Asteraceae.

15. The method of claim 14 wherein the organic extract of the Asteraceae family is selected from the genera consisting of *Artemisia*, *Aster*, *Blumea*, *Cichorium*, *Crassocephallum*, *Silybum*, *Sonchus*, and *Taraxacum*.

16. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Brassicales order is selected from the plant family Brassicaceae.

17. The method of claim 16 wherein the organic extract of the Brassicaceae family is selected from the genera consisting of *Brassica* and *Capsella*.

18. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Cactales order is selected from the plant family Cactaceae.

19. The method of claim 18 wherein the organic extract of the Cactaceae family is from the genus *Hylocereus*.

20. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Caryophyllales order is selected from the plant families consisting of *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae*, *Phytolaccaceae* and *Polygonaceae*.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

52

21. The method of claim 20 wherein the organic extract of the Amaranthaceae family is from the genus *Alternanthera*.

22. The method of claim 20 wherein the organic extract of the Caryophyllaceae family is from the genus *Stellaria*.

23. The method of claim 20 wherein the organic extract of the Phytolaccaceae family is from the genus *Phytolacca*.

24. The method of claim 20 wherein the organic extract of the Polygonaceae family is selected from the genera consisting of *Polygonum* and *Rumex*.

25. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Cucurbitales order is selected from the plant family Cucurbitaceae.

26. The method of claim 25 wherein the organic extract of the Cucurbitaceae family is selected from the genera consisting of *Citrullus* and *Mukia*.

27. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Elaeagnales order is selected from the plant family Elaeagnaceae.

28. The method of claim 27 wherein the organic extract of the Elaeagnaceae family is selected from the genus consisting of *Elaeagnus*.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

53

29. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Fagales order is selected from the plant family Fagaceae.

30. The method of claim 29 wherein the organic extract of the Fagaceae family is selected from the genus consisting of Castanea.

31. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Gnetales order is selected from the plant family Ginkgoaceae.

32. The method of claim 31 wherein the organic extract of the Ginkgoaceae family is from the genus Ginkgo.

33. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Graminales order is selected from the plant family Poaceae.

34. The method of claim 33 wherein the organic extract of the Poaceae family is selected from the genera consisting of Coix, Eleusine, Hordeum, Oryza, and Zea.

35. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Lamiales order is selected from the plant families Lamiaceae and Verbenaceae.

36. The method of claim 35 wherein the organic extract of the Lamiaceae family is selected from the genera consisting of Lycopus, Ocimum, Perilla, Prunella and Salvia.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

54

37. The method of claim 35 wherein the organic extract of the Verbenaceae family is selected from the genus consisting of Vitex.

38. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Liliales order is selected from the plant families consisting of Dioscoreaceae and Liliaceae.

39. The method of claim 38 wherein the organic extract of the Dioscoreaceae family is from the genus Dioscorea.

40. The method of claim 38 wherein the organic extract of the Liliaceae family is selected from the genera consisting of Allium, Lilium, Smilax, and Trillium.

41. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Malvales order is selected from the plant family Malvaceae and Sterculiaceae.

42. The method of claim 41 wherein the organic extract of the Malvaceae family is from the genus Abutilon.

43. The method of claim 41 wherein the organic extract of the Sterculiaceae family is from the genus Sterculia.

44. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Musales order is selected from the plant families consisting of Marantaceae and Musaceae.

45. The method of claim 44 wherein the organic extract of the Marantaceae family is from the genus Maranta.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

55

46. The method of claim 44 wherein the organic extract of the Musaceae family is from the genus *Musa*.

47. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Myrtales order is selected from the plant families consisting of Balanophoraceae and Onagraceae.

48. The method of claim 47 wherein the organic extract of the Balanophoraceae family is from the genus *Cynomorium*.

49. The method of claim 47 wherein the organic extract of the Onagraceae family is from the genus *Oenothera*.

50. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Papaverales order is selected from the plant families consisting of Capparidaceae and Papaveraceae.

51. The method of claim 50 wherein the organic extract of the Capparidaceae family is from the genus *Capparis*.

52. The method of claim 50 wherein the organic extract of the Papaveraceae family is from the genus *Papaver*.

53. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Plantaginales order is selected from the plant family Plantaginaceae.

54. The method of claim 53 wherein the organic extract of the Plantaginaceae family is from the genus *Plantago*.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

56

55. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Polemoniales order is selected from the plant families consisting of Boraginaceae, Convolvulaceae, and Solanaceae.

56. The method of claim 55 wherein the organic extract of the Boraginaceae family is from the genus Cordia.

57. The method of claim 55 wherein the organic extract of the Convolvulaceae family is from the genus Ipomoea.

58. The method of claim 55 wherein the organic extract of the Solanaceae family is selected from the genera consisting of Capsicum and Solanum.

59. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Ranales order is selected from the plant family Menispermaceae.

60. The method of claim 59 wherein the organic extract of the Menispermaceae family is from the genus Cissampelos.

61. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Rosales order is selected from the plant family Fabaceae.

62. The method of claim 61 wherein the organic extract of the Fabaceae family is selected from the genera consisting of Acacia, Albizzia, Glycine, Phaseolus, Trigonella, and Vigna.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

57

63. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Rubiales order is selected from the plant families consisting of Rubiaceae and Valerianaceae.

64. The method of claim 63 wherein the organic extract of the Rubiaceae family is from the genus *Asperula*.

65. The method of claim 63 wherein the organic extract of the Valerianaceae family is from the genus *Valeriana*.

66. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Rutales order is selected from the plant family Rutaceae.

67. The method of claim 66 wherein the organic extract of the Rutaceae family is from the genus *Citrus*.

68. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Scrophulariales order is selected from the plant family Acanthaceae.

69. The method of claim 68 wherein the organic extract of the Acanthaceae family is from the genus *Acanthus*.

70. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Umbellales order is selected from the plant family Apiaceae.

71. The method of claim 70 wherein the organic extract of the Apiaceae family is selected from the genera consisting of *Angelica*, *Carum*, *Centella*, *Eryngium*, and *Peucedanum*.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

58

72. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Urticales order is selected from the plant families consisting of Moraceae and Ulmaceae.

73. The method of claim 72 wherein the organic extract of the Moraceae family is from the genus Morus.

74. The method of claim 72 wherein the organic extract of the Ulmaceae family is from the genus Ulmus.

75. The method of claim 3 wherein the organic extract of the Vioales order is selected from the plant families Flacourtiaceae and Passifloraceae.

76. The method of claim 75 wherein the organic extract of the Flacourtiaceae family is from the genus Pangium.

77. The method of claim 75 wherein the organic extract of the Passifloraceae family is from the genus Passiflora.

78. The method of claim 1 wherein the organic extract is a purified composition obtained by a method comprising:

- (a) contacting the plant with an organic solvent to remove an extract from the plant wherein the extract
- 5 inhibits COX-2 activity; and
- (b) isolating the extract with COX-2 inhibitory activity.

79. The method of claim 78 wherein the extract selectively inhibits COX-2 activity.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

59

80. The method of claim 78 wherein step (a) further comprises mixing the plant with the organic solvent and stirring the resulting mixture at a temperature between about 25° C and the boiling point of said solvent for at least one minute.

81. The method of claim 78 wherein the organic solvent is selected from the group consisting of hydrocarbon solvents, ethers, chlorinated solvents, acetone, ethyl acetate, butanol, ethanol, methanol, isopropyl alcohol and mixtures thereof.

82. The method of claim 81 wherein the organic solvent is non-polar.

83. The method of claim 82 wherein the non-polar organic solvent is dichloromethane or hexane.

84. The method of claim 78 wherein step (b) further comprises separating the solvent from the organic extract by evaporating the solvent.

85. A method of treating or preventing COX-2 mediated inflammation or an inflammation-associated disorder in an organism, the method comprising administering to the organism a composition comprising a therapeutically or prophylactically effective amount of the purified composition according to claim 78.

86. The method of claim 85 wherein the inflammation-associated disorder is arthritis.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

60

87. The method of claim 85 wherein the inflammation-associated disorder is pain.

88. The method of claim 85 wherein the inflammation-associated disorder is fever.

89. The method of claim 85 for use in the treatment or prevention of cancer.

90. The method of claim 89 wherein the cancer is epithelial cell cancer.

91. The method of claim 90 wherein the epithelial cell cancer is colon, breast, prostate, bladder, or lung cancer.

92. The method of claim 85 for use in the treatment or prevention of central nervous system disorders.

93. The method of claim 92 wherein the central nervous system disorder is Alzheimer's Disease.

WO 02/47708

PCT/US01/48912

1/22

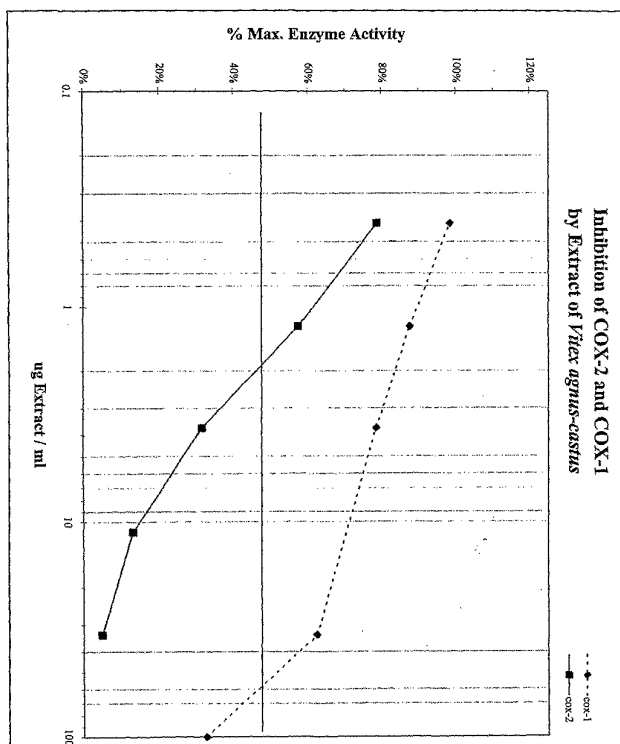


FIGURE 1

WO 02/47708

PCT/US01/48912

2/22

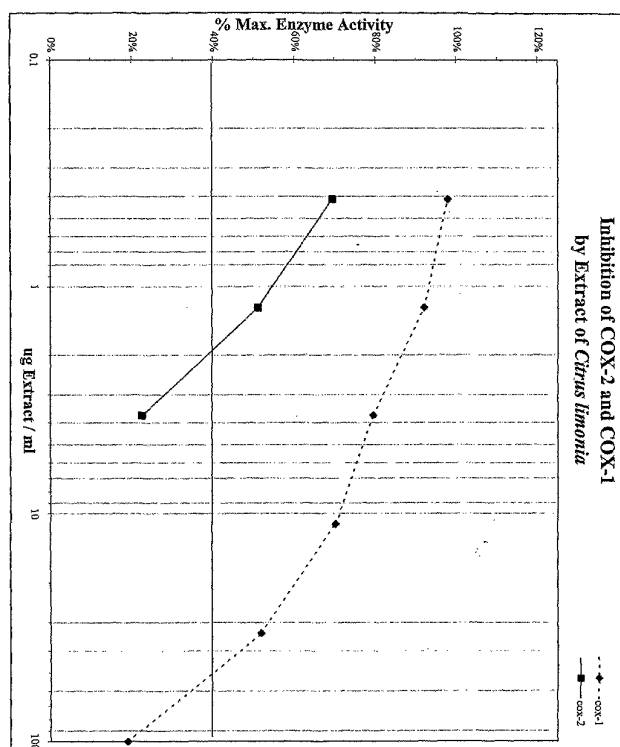


FIGURE 2

WO 02/47708

PCT/US01/48912

3/22

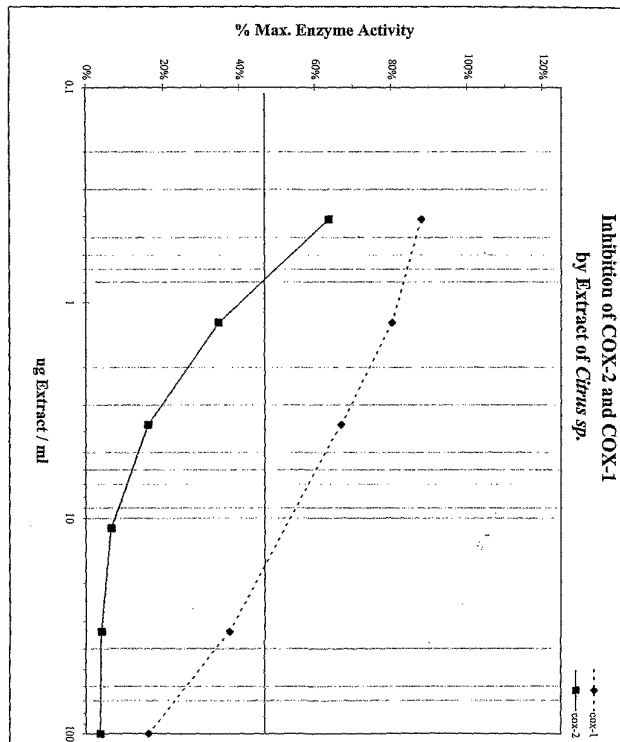


FIGURE 3

WO 02/47708

PCT/US01/48912

4/22

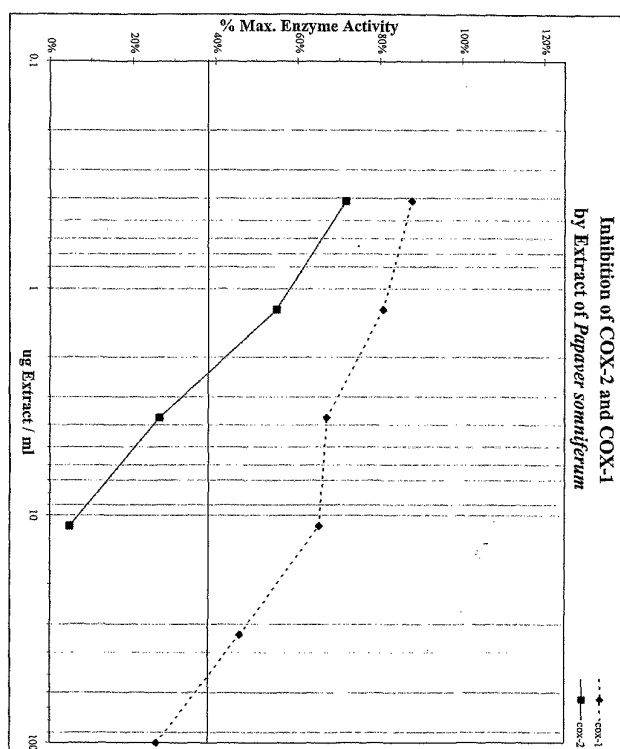


FIGURE 4

WO 02/47708

PCT/US01/48912

5/22

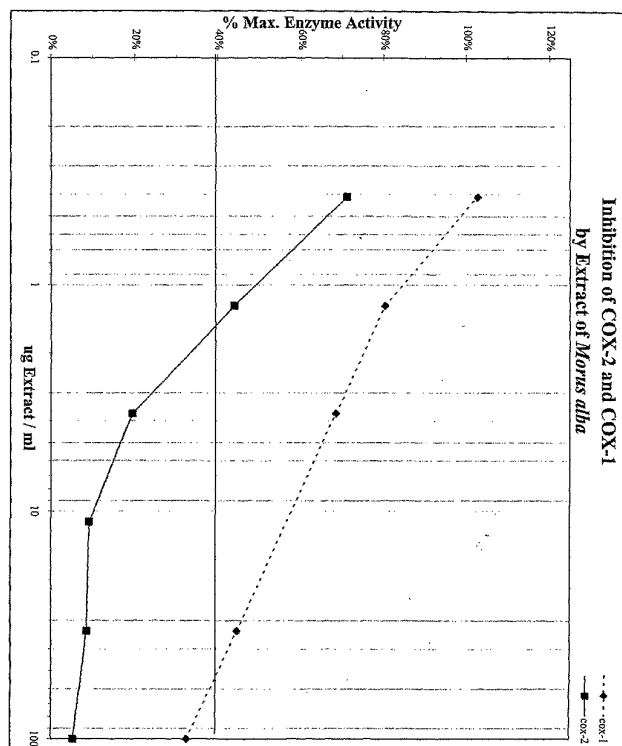


FIGURE 5

WO 02/47708

PCT/US01/48912

6/22

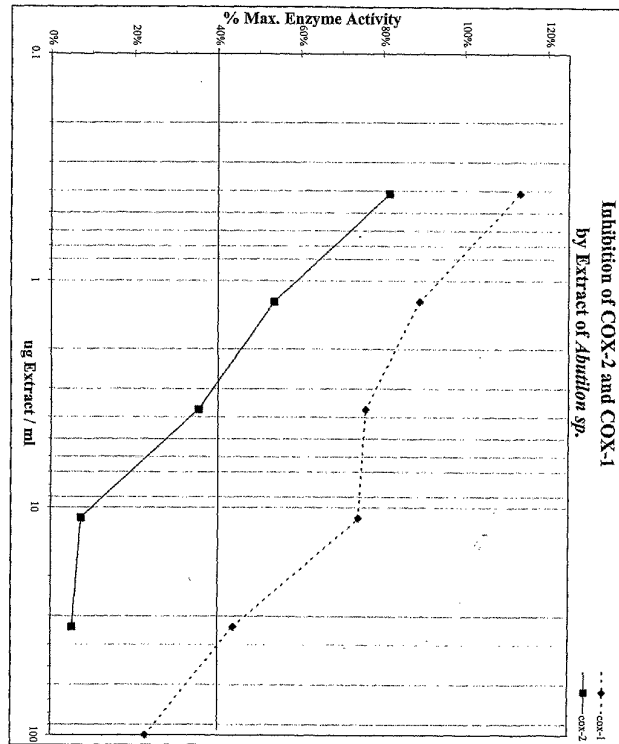


FIGURE 6

WO 02/47708

PCT/US01/48912

7/22

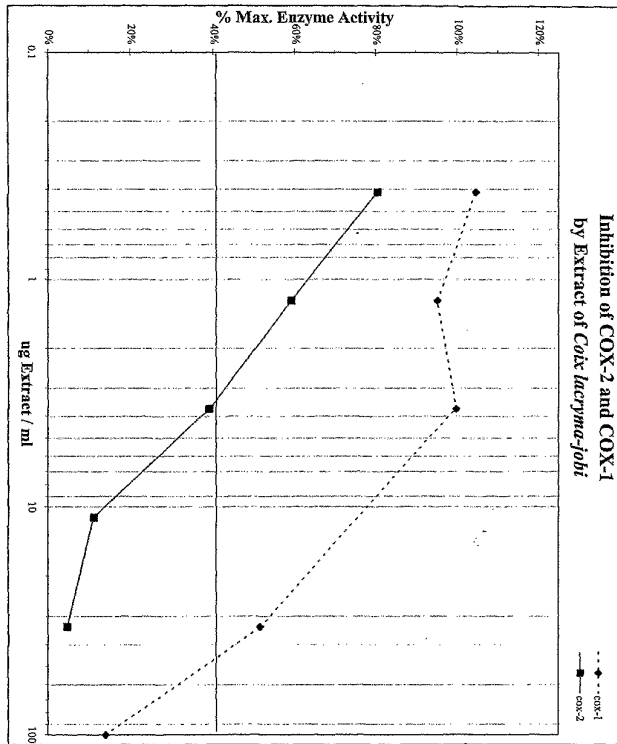


FIGURE 7

WO 02/47708

PCT/US01/48912

8/22

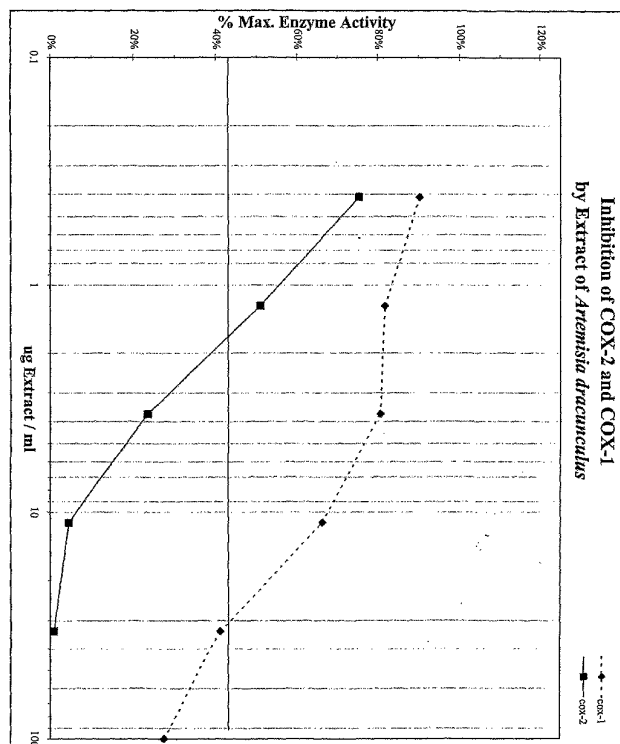


FIGURE 8

WO 02/47708

PCT/US01/48912

9/22

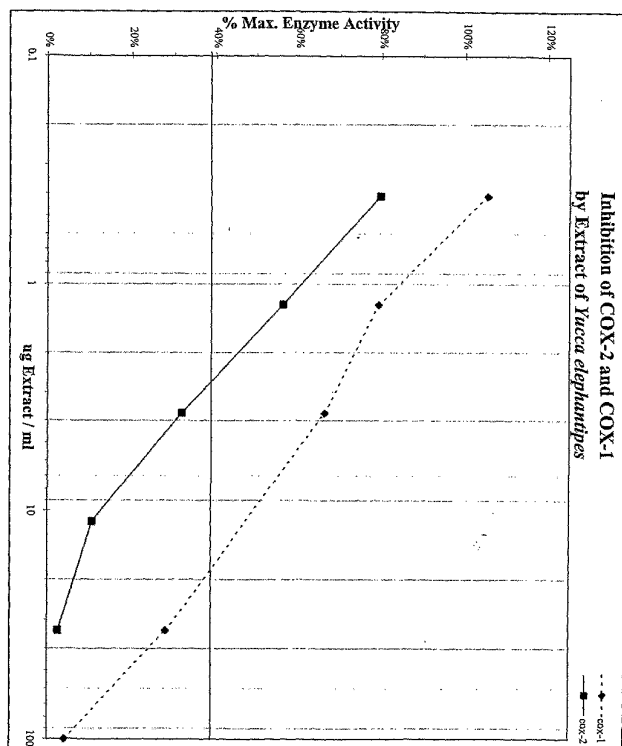


FIGURE 9

WO 02/47708

PCT/US01/48912

10/22

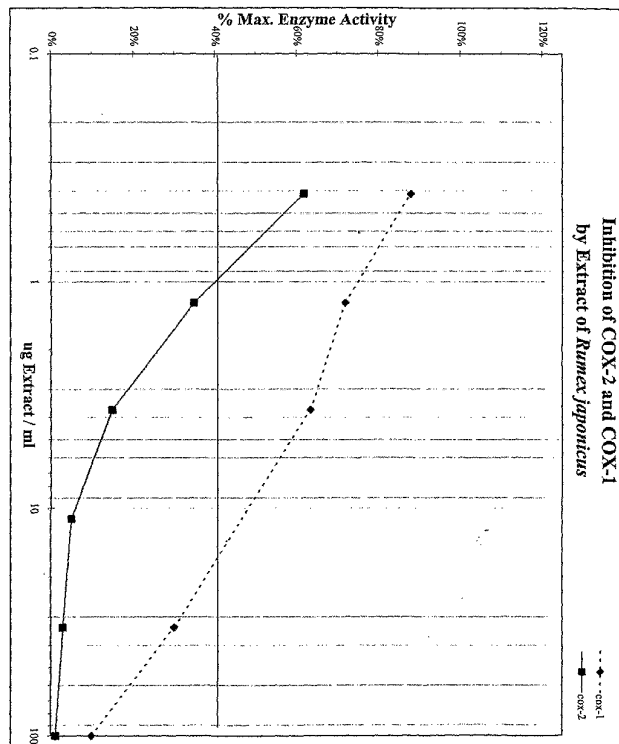


FIGURE 10

WO 02/47708

PCT/US01/48912

11/22

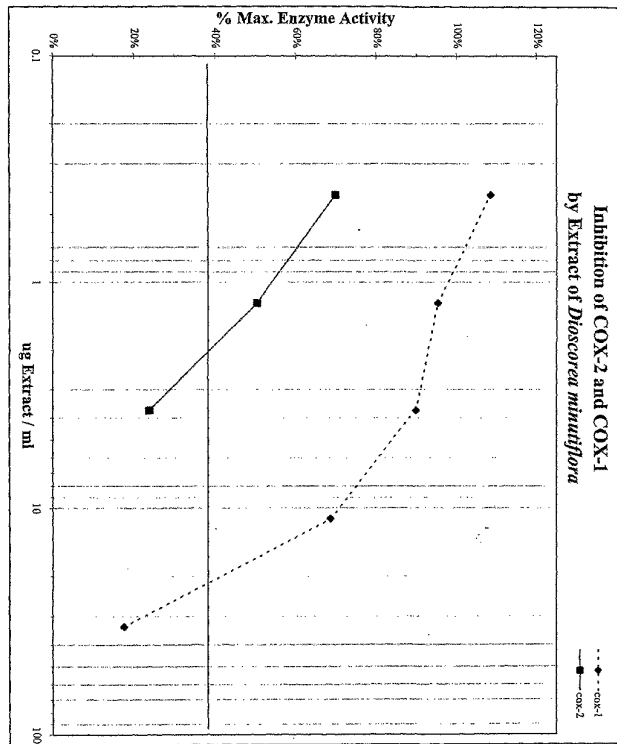


FIGURE 11

WO 02/47708

PCT/US01/48912

12/22

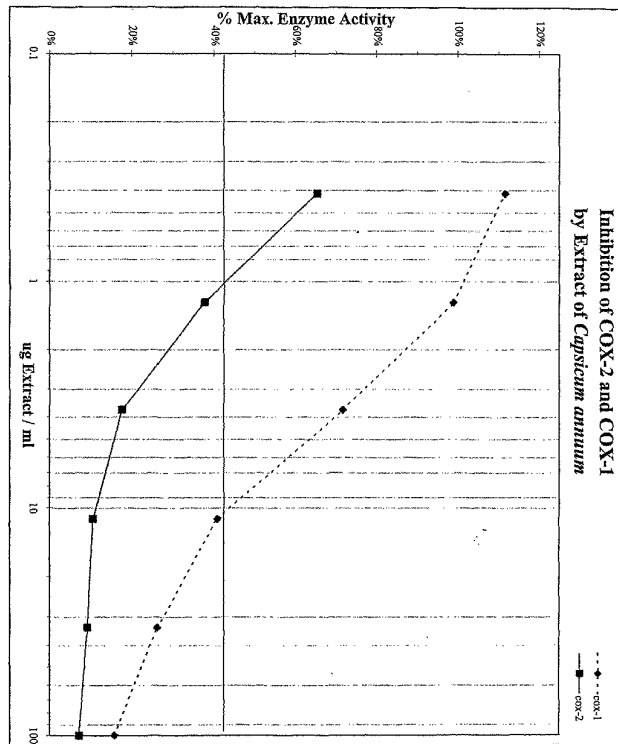


FIGURE 12

WO 02/47708

PCT/US01/48912

13/22

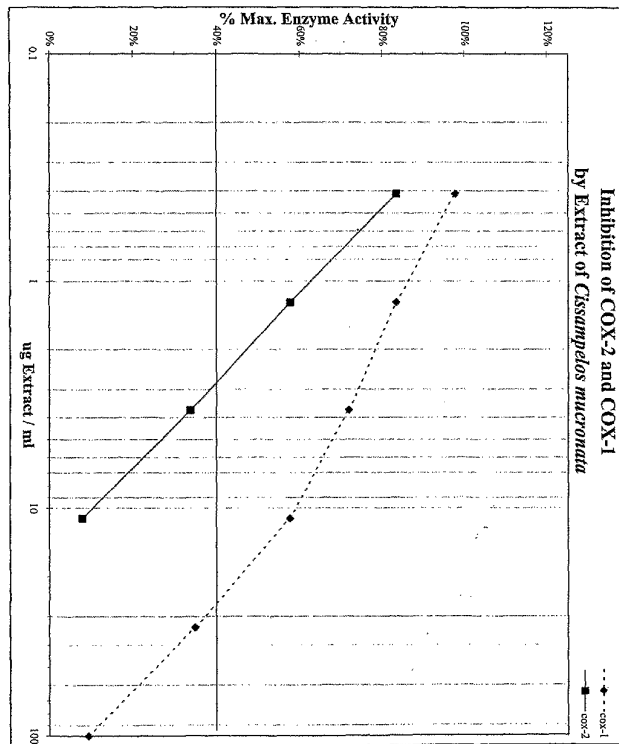


FIGURE 13

WO 02/47708

PCT/US01/48912

14/22

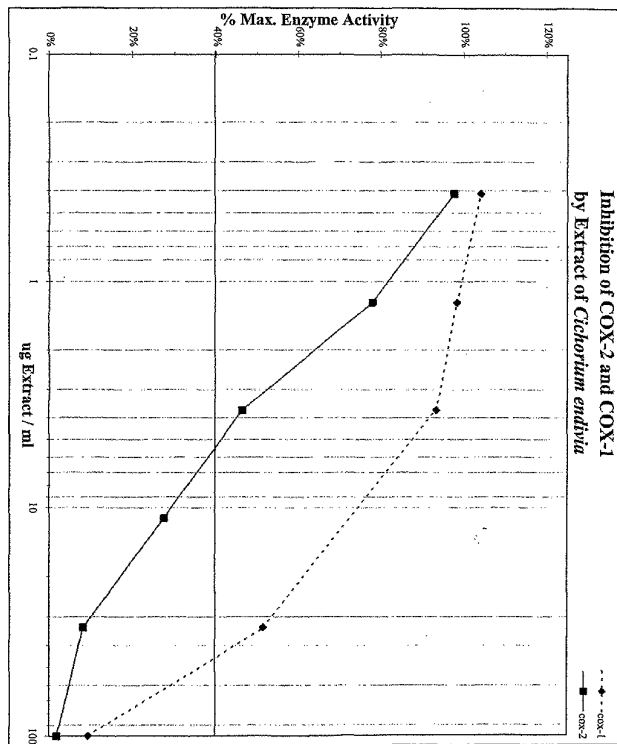


FIGURE 14

WO 02/47708

PCT/US01/48912

15/22

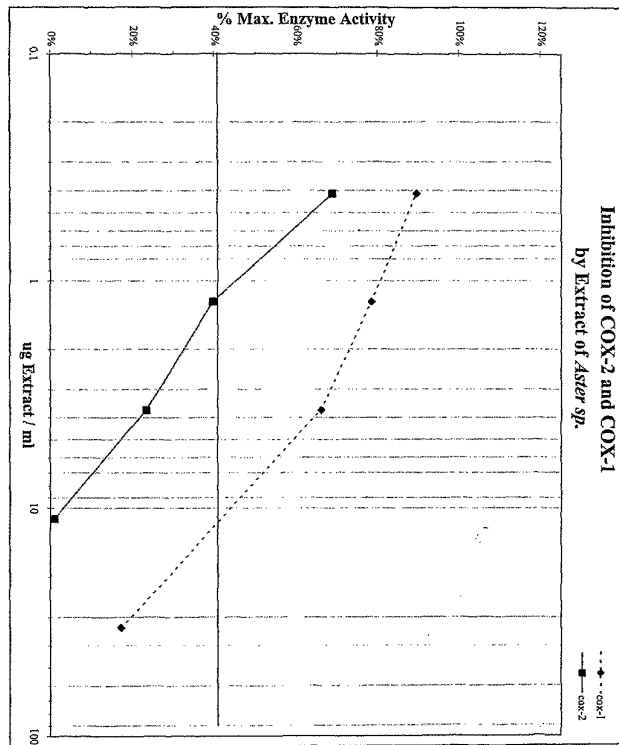


FIGURE 15

WO 02/47708

PCT/US01/48912

16/22

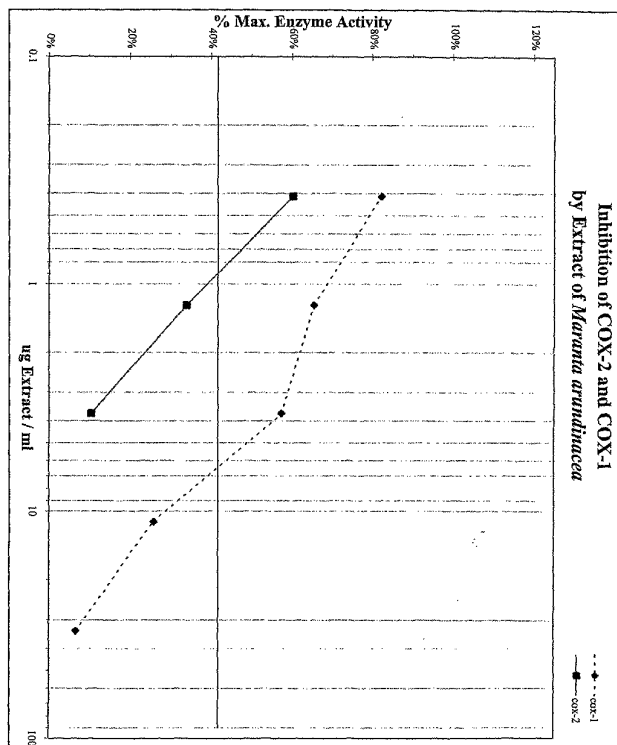


FIGURE 16

WO 02/47708

PCT/US01/48912

17/22

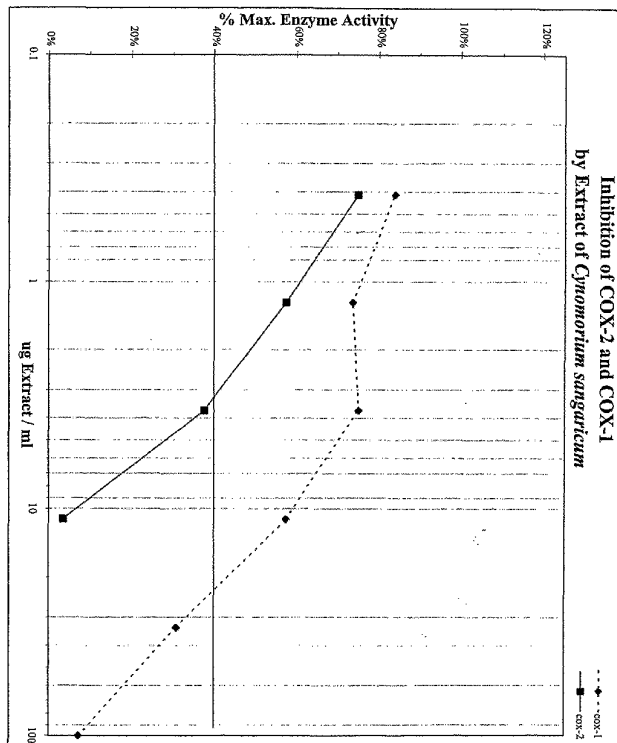


FIGURE 17

WO 02/47708

PCT/US01/48912

18/22

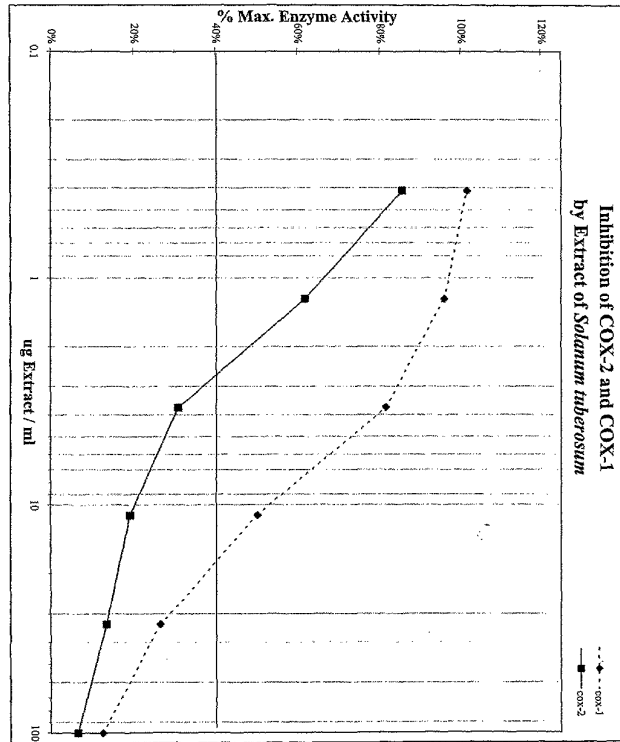


FIGURE 18

WO 02/47708

PCT/US01/48912

19/22

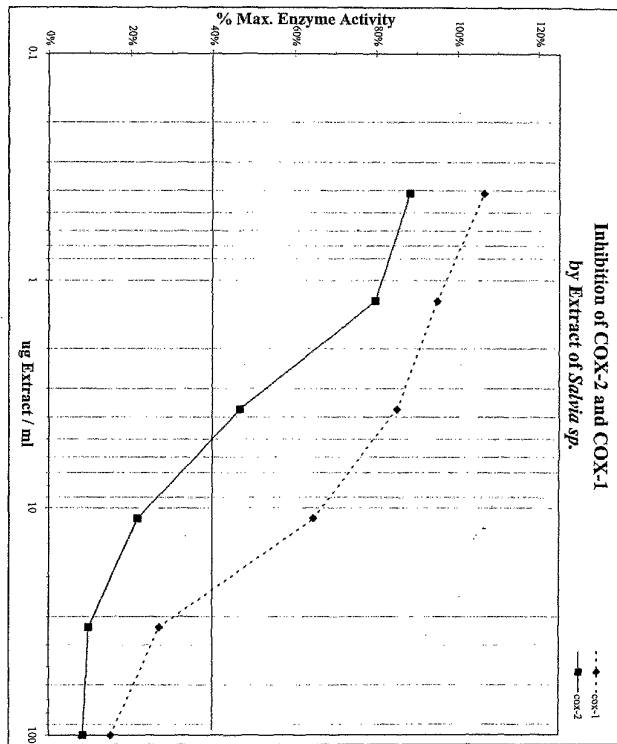


FIGURE 19

WO 02/47708

PCT/US01/48912

20/22

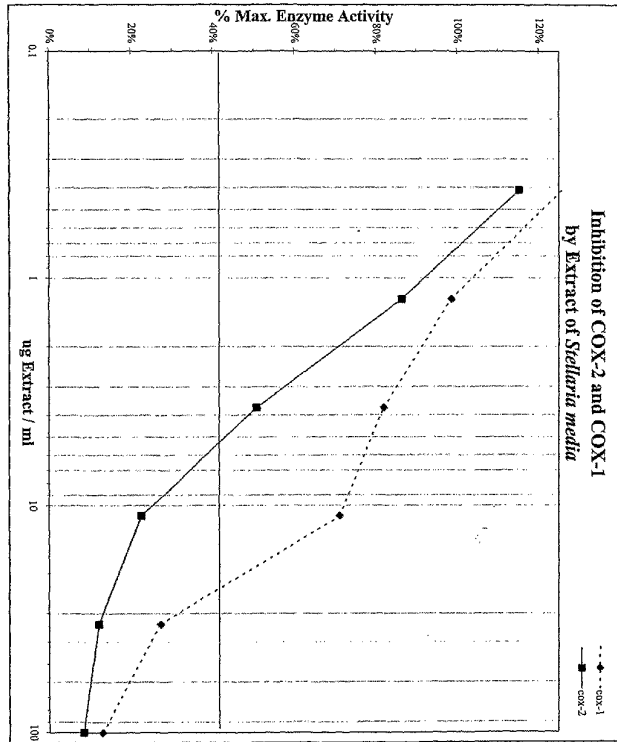


FIGURE 20

WO 02/47708

PCT/US01/48912

21/22

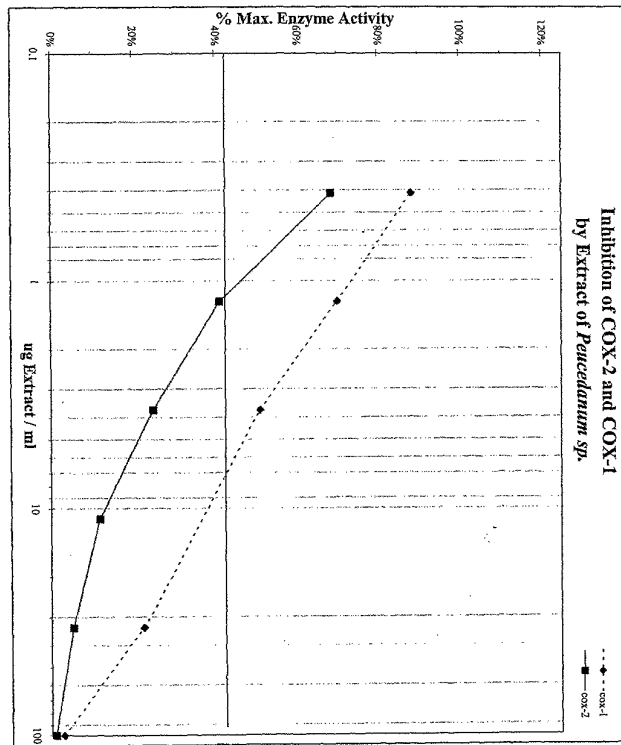


FIGURE 21

WO 02/47708

PCT/US01/48912

22/22

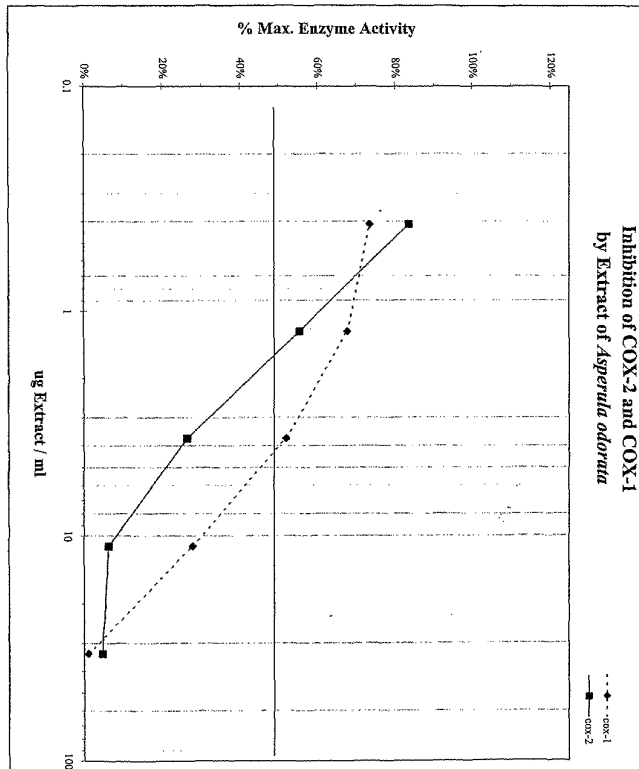


FIGURE 22

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 June 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2002/047708 A3(51) International Patent Classification⁷: A61K 35/78, A61P 29/00

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): OBUKOWICZ, Mark, G. [US/US]; 655 North Kirkwood Road, Kirkwood, MO 63122 (US); HUMMERT, Susan, L. [US/US]; 3447 St. Mark Lane, St. Ann, MO 63074 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2001/048912(22) International Filing Date:
13 December 2001 (13.12.2001)

(74) Agents: DOTY, Kathryn, J. et al.; Senniger, Powers, Leavitt & Roedel, One Metropolitan Square, 16th Floor, St. Louis, MO 63102 (US).

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (national): 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, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

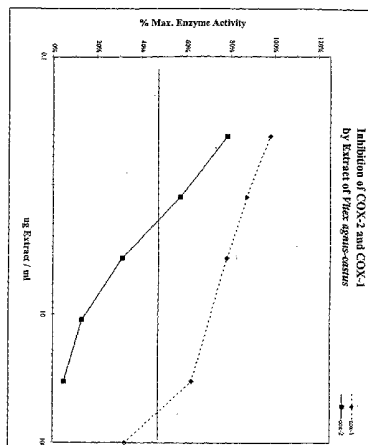
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/737,892 15 December 2000 (15.12.2000) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

[Continued on next page]

(54) Title: SELECTIVE COX-2 INHIBITION FROM EDIBLE PLANT EXTRACTS



(57) Abstract: The present invention is directed toward a method for inhibiting COX-2 in an organism. In particular, the method is preferably directed toward selectively inhibiting COX-2 in an organism. The method comprises the step of administering to the organism an organic extract isolated from an edible plant wherein such extract inhibits COX-2. A method to purify a composition that exhibits COX-2 inhibition and COX-2 selective inhibition from the organic extract is also provided. In addition, a method for treating and/or preventing COX-2 mediated inflammation or inflammation-associated disorders in an organism is provided.

WO 2002/047708 A3

WO 2002/047708 A3



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).

(88) Date of publication of the international search report:
31 December 2003

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 "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Interr. # Application No. PCT/US 01/48912
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K35/78 A61P29/00		
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) IPC 7 A61K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 56348 A (MONSANTO CO ; CORLEY DAVID G (US); OBUKOWICZ MARK (US)) 28 September 2000 (2000-09-28) cited in the application page 1, line 5 - line 15 claims 1-21	1-5, 78-85
X	WO 00 40258 A (DAVIS CRAIG KENDALL CHARLES ; BUTTERS DESLEY ETHEL (AU); INT CELERY) 13 July 2000 (2000-07-13) page 19, line 10 - line 32 claims 1-40 --- -/-	1-5, 85-93
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim 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 "I" 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. "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 October 2003		Date of mailing of the international search report 22. 10. 2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-3340, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Siatou, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern I Application No PCT/US 01/48912
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 33824 A (UNIV MICHIGAN ;BOOREN ALDEN M (US); GRAY JAMES I (US); WANG HAIBO) 15 June 2000 (2000-06-15) claims 1-20 page 1, line 24 page 5, line 1 - line 7 page 5, line 16 - line 20 page 13, line 9 - line 15 page 21; example 6 ---	1-5, 85-93
X	WO 98 17292 A (SLOTH WEIDNER MORTEN) 30 April 1998 (1998-04-30) page 7, line 17 -page 8, line 6 claims 1-17 ---	1-5, 85-93
X	DATABASE WPI Section Ch. Week 199208 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1992-060692 XP002238410 & JP 04 005237 A (NONOKAWA SHOJI YG), 9 January 1992 (1992-01-09) abstract ---	85-93
X	GB 2 335 599 A (PHYTOPHARM PLC) 29 September 1999 (1999-09-29) page 9, line 5 - line 13 claims 1-12 ---	85,92,93
A	RESCH M ET AL: "5-LIPOXYGENASE AND CYCLOOXYGENASE-1 INHIBITORY ACTIVE COMPOUNDS FROM ATRACTYLODES LANCEA" JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, XX, XX, vol. 61, 1998, pages 347-350, XP000916172 ISSN: 0163-3864 cited in the application the whole document ---	1-7, 33-37, 50-52, 72-74, 78-93
X	WO 00 72861 A (ARMADILLO PHARMACEUTICALS INC ;ASHRAF KHORASSANI MEHDI (US); TAYLO) 7 December 2000 (2000-12-07) page 17, line 23 - line 29 page 19, line 8 -page 21, line 19 ---	1-5, 33-37, 50-52, 78-84
X	WO 99 62532 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 9 December 1999 (1999-12-09) claims 1-23,48-51 page 6, line 19 - line 20 ---	1-5,33, 34, 78-85, 89-91
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern	Application No
PCT/US	01/48912

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 824 312 A (UNGER EVAN C ET AL) 20 October 1998 (1998-10-20) column 5, line 22 -column 6, line 39 column 7, line 59 -column 8, line 7 claims 1-18 -----	1-7, 33-35, 50,78-84
P,X, L	US 6 217 875 B1 (OKADA TADASHI ET AL) 17 April 2001 (2001-04-17) Family member of JP-A-10298098 which was published on time claims 1-24 column 6, line 22 - line 37 & JP 10 298098 A 10 November 1998 (1998-11-10) -----	1-3,35, 36, 78-81, 84,85,89
X		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/48912**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(e) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-93 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 64(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-7, 33-37, 50-52, 72-74, 78-93
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01 /8912

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-5 (in part), 6-7, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the agavales order.

2. Claims: 1-5 (in part), 8-9, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the apocynales order.

3. Claims: 1-5 (in part), 10-11, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the arales order.

4. Claims: 1-5 (in part), 12-13, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the aristolochiales order.

5. Claims: 1-5 (in part), 14-15, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the asterales order.

6. Claims: 1-5 (in part), 16-17, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the brassicales order.

7. Claims: 1-5 (in part), 18-19, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the cactales order.

8. Claims: 1-5 (in part), 20-24, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of

International Application No. PCT/US 01 /8912

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the caryophyllales order.

9. Claims: 1-5 (in part), 25-26, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the cucurbitales order.

10. Claims: 1-5 (in part), 27-28, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the eleagnales order.

11. Claims: 1-5 (in part), 29-30, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the fagales order.

12. Claims: 1-5 (in part), 31-32, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the gnetales order.

13. Claims: 1-5 (in part), 33-34, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the graminales order.

14. Claims: 1-5 (in part), 35-37, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the lamiales order.

15. Claims: 1-5 (in part), 38-40, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the liliales order.

16. Claims: 1-5 (in part), 41-43, 78-93 (in part)

International Application No. PCT/US 01 /48912

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

- Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the malvales order.
17. Claims: 1-5 (in part), 44-46, 78-93 (in part)
- Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the musales order.
18. Claims: 1-5 (in part), 47-49, 78-93 (in part)
- Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the myrtales order.
19. Claims: 1-5 (in part), 50-52, 78-93 (in part)
- Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the papaverales order.
20. Claims: 1-5 (in part), 53-54, 78-93 (in part)
- Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the plantaginales order.
21. Claims: 1-5 (in part), 55-58, 58-93 (in part)
- Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the polemoniales order.
22. Claims: 1-5 (in part), 59-60, 78-93 (in part)
- Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the ranales order.
23. Claims: 1-5 (in part), 61-62, 78-93 (in part)
- Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the rosales order.
24. Claims: 1-5 (in part), 63-65, 78-93 (in part)

International Application No. PCT/US 01 A8912

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the rubiales order.

25. Claims: 1-5 (in part), 66-67, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the rutales order.

26. Claims: 1-5 (in part), 68-69, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the scrophulariales order.

27. Claims: 1-5 (in part), 70-71, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the umbellales order.

28. Claims: 1-5 (in part), 72-74, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the urticales order.

29. Claims: 1-5 (in part), 75-77, 78-93 (in part)

Method for selective inhibition of COX2 and treatment of COX2 related disorders by using an organic extract of a plant belonging to the violaes order.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/48912

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0056348	A	28-09-2000	US 2001006686 A1	05-07-2001
			AU 3893500 A	09-10-2000
			BR 0009143 A	26-12-2001
			CA 2367699 A1	28-09-2000
			CN 1362881 T	07-08-2002
			EP 1171142 A1	16-01-2002
			JP 2002539269 T	19-11-2002
			WO 0056348 A1	28-09-2000
			US 2002192305 A1	19-12-2002
			US 2001024664 A1	27-09-2001
			ZA 200107836 A	23-12-2002
WO 0040258	A	13-07-2000	AU 1811700 A	24-07-2000
			EP 1140125 A1	10-10-2001
			US 2002081343 A1	27-06-2002
			WO 0040258 A1	13-07-2000
WO 0033824	A	15-06-2000	US 6423365 B1	23-07-2002
			US 6194469 B1	27-02-2001
			AU 2172100 A	26-06-2000
			AU 2175400 A	26-06-2000
			AU 2358400 A	26-06-2000
			CA 2354042 A1	15-06-2000
			CN 1334740 T	06-02-2002
			CN 1334704 T	06-02-2002
			CN 1335775 T	13-02-2002
			EP 1137429 A2	04-10-2001
			JP 2002531473 T	24-09-2002
			JP 2002531109 T	24-09-2002
			JP 2002531493 T	24-09-2002
			WO 0033824 A2	15-06-2000
			WO 0033667 A2	15-06-2000
			WO 0033670 A1	15-06-2000
			US 6150408 A	21-11-2000
			US 6623743 B1	23-09-2003
			US 2001020009 A1	06-09-2001
			US 2001002407 A1	31-05-2001
WO 9817292	A	30-04-1998	AT 211918 T	15-02-2002
			AU 711019 B2	07-10-1999
			AU 4615897 A	15-05-1998
			DE 69709691 D1	21-02-2002
			DE 69709691 T2	22-08-2002
			WO 9817292 A1	30-04-1998
			DK 1007067 T3	06-05-2002
			EP 1007067 A1	14-06-2000
			ES 2172006 T3	16-09-2002
			JP 2001501919 T	13-02-2001
			PT 1007067 T	31-07-2002
			US 6217877 B1	17-04-2001
JP 4005237	A	09-01-1992	JP 3156787 B2	16-04-2001
GB 2335599	A	29-09-1999	AU 748138 B2	30-05-2002
			AU 3157499 A	18-10-1999
			AU 3158199 A	18-10-1999
			BR 9909109 A	12-12-2000
			BR 9909110 A	12-12-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>Information on patent family members</div> <div> Inter # Application No PCT/US 01/48912 </div> </div>				
GB 2335599	A		CA 2325633 A1 CA 2325634 A1 CN 1302208 T CN 1301166 T EP 1066042 A2 EP 1066033 A1 WO 9948507 A2 WO 9948482 A2 HR 20000637 A1 HR 20000638 A1 HU 0101693 A2 HU 0103654 A2 JP 2003524581 T JP 2002507572 T NO 20004803 A NO 20004804 A PL 343423 A1 PL 343508 A1 TR 200002773 T2 TR 200002774 T2 US 2002193317 A1 US 2003118673 A1 ZA 200006046 A ZA 200006047 A GB 2347676 A US 2003032604 A1 US 6258386 B1 US 2001043955 A1	30-09-1999 30-09-1999 04-07-2001 27-06-2001 10-01-2001 10-01-2001 30-09-1999 30-09-1999 30-04-2001 30-04-2001 28-12-2001 28-02-2002 19-08-2003 12-03-2002 27-11-2000 09-11-2000 13-08-2001 27-08-2001 21-11-2001 21-06-2001 19-12-2002 26-06-2003 28-01-2002 28-01-2002 13-09-2000 13-02-2003 10-07-2001 22-11-2001
WO 0072861	A	07-12-2000	AU 5867600 A CA 2414094 A1 EP 1183039 A1 JP 2003500452 T WO 0072861 A1	18-12-2000 07-12-2000 06-03-2002 07-01-2003 07-12-2000
WO 9962532	A	09-12-1999	US 6277418 B1 AU 4217099 A WO 9962532 A1	21-08-2001 20-12-1999 09-12-1999
US 5824312	A	20-10-1998	NONE	
US 6217875	B1	17-04-2001	JP 10298098 A	10-11-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/10	A 6 1 K 35/78	J
A 6 1 P 7/06	A 6 1 K 35/78	K
A 6 1 P 9/00	A 6 1 K 35/78	N
A 6 1 P 9/10	A 6 1 K 35/78	Q
A 6 1 P 11/00	A 6 1 K 35/78	R
A 6 1 P 11/02	A 6 1 K 35/78	S
A 6 1 P 11/06	A 6 1 K 35/78	T
A 6 1 P 11/08	A 6 1 K 35/78	U
A 6 1 P 13/12	A 6 1 K 35/78	V
A 6 1 P 17/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 19/06	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 25/06	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 11/08	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 17/00	
	A 6 1 P 19/02	
	A 6 1 P 19/06	
	A 6 1 P 19/08	
	A 6 1 P 21/04	
	A 6 1 P 25/00	
	A 6 1 P 25/02	
	A 6 1 P 25/06	
	A 6 1 P 25/28	
	A 6 1 P 27/02	
	A 6 1 P 29/00	
	A 6 1 P 29/00	1 0 1
	A 6 1 P 31/12	
	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 37/08	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(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,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 オブコヴィチュ, マーク・ジー

アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 1 2 2, カークウッド, ノース・カークウッド・ロード 6 5 5

(72)発明者 ハンマート, スーザン・エル

アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 0 7 4, セント・アン, セント・マーク・レイン 3 4 4 7

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA17 BA44 CA13 CA14 CA15 DC32
MA01 MA52 MA55 MA60 NA14 ZA022 ZA072 ZA082 ZA162 ZA202
ZA212 ZA222 ZA332 ZA342 ZA362 ZA452 ZA552 ZA592 ZA612 ZA662
ZA672 ZA682 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZB072 ZB112 ZB132 ZB152
ZB262 ZB332 ZC202 ZC312 ZC352
4C088 AB02 AB12 AB13 AB14 AB15 AB19 AB23 AB26 AB27 AB28
AB29 AB34 AB35 AB38 AB40 AB41 AB43 AB48 AB59 AB61
AB62 AB71 AB73 AB74 AB75 AB77 AB78 AB80 AB84 AB85
AC01 BA08 BA37 CA06 CA07 CA09 CA11 CA14 CA15 MA01
MA52 MA55 MA60 NA14 ZA02 ZA07 ZA08 ZA16 ZA20 ZA21
ZA22 ZA33 ZA34 ZA36 ZA45 ZA55 ZA59 ZA61 ZA66 ZA67
ZA68 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB07 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26
ZB33 ZC20 ZC31 ZC35