(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 24 591 T2** 2007.09.06

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 363 648 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 24 591.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/KR01/02224**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 274 005.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/074320**
(86) PCT-Anmeldetag: **20.12.2001**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **26.09.2002**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.11.2003**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **15.11.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.09.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 31/704*** (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61K 36/532 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
2001009977 27.02.2001 KR

(73) Patentinhaber:
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, KR

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR

(72) Erfinder:
LEE, Hyeong Kyu, 305-755 Daejeon, KR; OH, Apt. 1130, Sei Ryang, 302-724 Daejeon, KR; AHN, Kyung Seop, 305-755 Daejeon, KR; CHOI, Soon Ja, 305-503 Daejeon, KR; KIM, Jung Hee, 314-150 Gongju-si, Choongcheong-namdo, KR; OH, Goo Taeg, 305-755 Daejeon, KR; HONG, Jung Joo, 137-771 Seoul, KR; PARK, Seong Kyu, 314-833 Gongju-si, Choongcheong-namdo, KR; NAMKUNG, 933-304 GajokSaenghwaldong, Woo, 151-057 Seoul, KR

(54) Bezeichnung: **AGASTACHE RUGOSA EXTRAKT MIT ENTZÜNDUNGSHEMMENDER WIRKUNG UND ANTIATHEROGENER WIRKUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, umfassend Agastache rugosa und Tilianin, erhalten daraus durch Trennungsreinigung, für Entzündungshemmung und Atherosklerosehemmung und genauer gesagt einen Extrakt von Agastache rugosa und Tilianin, erhalten daraus durch Trennungsreinigung, welche beim Verhindern und Behandeln von nicht nur Entzündungskrankheiten, sondern auch Atherosklerose, verbunden mit Entzündungsreaktionen, und Krankheit im Kreislaufsystem, verursacht durch Atherosklerose, wirksam sind, weil sie ausgezeichnet beim Hemmen der Aktivität des Komplementsystems als einem Faktor von Entzündungsreaktionen, der Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) und des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls-1 (VCAM-1) und der Erzeugung von Stickstoffmonoxid (NO) sind. Sie können auch signifikant die Entwicklung von Atherosklerose aufgrund von Entzündungsreaktionen verringern.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Wenn es eine Beschädigung in einem Gewebe oder einer Zelle oder eine Infektion durch eine fremde Substanz in einem menschlichen Körper (z.B. Bakterien, Schimmelpilze, Viren, verschiedenartige Allergie herbeiführende Materialien) gibt, bringt sie gewöhnlich eine Entzündungsreaktion mit sich, ausgedrückt als eine Serie komplexer physiologischer Reaktionen wie beispielsweise Aktivierung von Enzym, Sekretion von entzündungsvermittelnden Materialien, Infiltration von Körperflüssigkeit, Zellbewegung und Schädigung von Geweben, die mit allen Arten von entzündungsvermittelnden Faktoren und Immunozyten in lokalen Blutgefäßen, in der Körperflüssigkeit verbunden sind, und als externe Symptome, wie beispielsweise Erythem, Ödem und Pyrexie. Normalerweise entfernen Entzündungsreaktionen externe Infektionsquellen, regenerieren beschädigte Gewebe und gewinnen die Lebensfunktion zurück, aber wenn ein Antigen nicht entfernt wird oder Entzündungsreaktionen aufgrund intrinsischer Substanzen übermäßig oder andauernd erfolgen, werden Entzündungsreaktionen zu den hauptsächlichen pathologischen Symptomen von Krankheiten (Überempfindlichkeitserkrankung, chronische Entzündung) und zu den Haupthindernissen in den Behandlungsverfahren wie beispielsweise Bluttransfusion, Arzneimittelverabreichung und Organtransplantation und dergleichen.

[0003] Die Auswirkungen von an Entzündungsreaktionen beteiligten Faktoren in bezug auf die vorliegende Erfindung werden wie folgt beschrieben.

[0004] Das Komplementsystem ist ein Hauptfaktor der Körperflüssigkeit, welches im frühen Stadium einer Immunreaktion eine Entzündung aktiviert und verstärkt. Aktive Proteine (Anaphylatoxine; C3a, C4a, C5a) und konjugierte Proteine (Membrane Attack Complex (Membranangriffskomplex) (MAC)), erzeugt in dem Aktivierungsprozeß des Komplementsystems, sind mit verschiedenen Entzündungskrankheiten (rheumatische Arthritis, Lupus erythematosus, Atemnotsyndrom bei Erwachsenen, Alzheimer-Krankheit) verbunden und werden oft zu den direkten Ursachen von superakuten Abstoßungen in der Organtransplantation.

[0005] ICAM-1 ist ein typisches Protein der Zelladhäsionsmolekül-Gruppe, das auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird. Normalerweise wird es in einem sehr niedrigem Niveau exprimiert, jedoch wenn es durch entzündungsvermittelnde Moleküle von Zytokinen, wie beispielsweise TNF-α, Interferon-γ und Interleukin-1β, stimuliert wird, wird das Niveau der Expression schnell beschleunigt, um eine Rolle in anhaftenden Entzündungszellen wie beispielsweise Monozyten oder Lymphozyten, die sich im Blut bewegen, und beim Bewegen der Entzündungszellen zu den Entzündungsgeweben zu spielen. Daher spielt die Expression von ICAM-1 eine wichtige Rolle bei der Vergrößerung einer Entzündung, wenn Entzündungszellen sich bewegen und sich in ihrem frühen Stadium auf den Entzündungsgeweben sammeln.

[0006] VCAM-1 ist eine der Zelladhäsionsmolekül-Gruppen, die auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert werden. Die Expression nimmt in den Endothelzellen von Blutgefäßen schnell zu, wenn atherosklerotische Läsionen im Tiermodell (Apolipoprotein-E-defiziente Mäuse, A.poE-/-) erzeugt werden, analog zu dem Fortschreiten humaner Atherosklerose. Und die Zunahme der VCAM-1-Expression steht in direkter Wechselbeziehung mit der Konzentration von Cholesterin-Lipoprotein niederer Dichte (Cholesterin-LDL) im Plasma. Daher verklebt, wenn atherosklerotische Läsionen induziert werden, VCAM-1, exprimiert in den Endothelzellen von Blutgefäßen, Monozyten und Lymphozyten im Blut, und diese Entzündungszellen sammeln sich unter Endothelzellen von Blutgefäßen, wobei sie so eine wichtige Rolle in der Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen spielen.

[0007] NO wird zusammen mit L-Citrullin erzeugt, nachdem L-Arginin durch Stickstoffmonoxid-Synthase

(NOS) oxidiert worden ist. NO ist ein vermittelndes Molekül, das durch Beeinflussen des Blutgefäßsystems an Vasodepression, Adhäsion und Koagulation von Blutplättchen, Neurotransmission, Bewegung des Verdauungsorganismus und Erektion des Penis beteiligt ist. Und NO schützt gegen eine mikrobielle Infektion, indem es nicht nur in Entzündungszellen, sondern auch in Nichtimmunzellen erzeugt wird. Inzwischen ist die induzierbare NOS (iNOS), eine von am Erzeugen von NO teilnehmenden NOS, unabhängig von Calcium oder Calmodulin und wird durch Stimulation von Lipopolysaccharid (LPS) und Zytokinen (IFN-γ, TNF und dergleichen) exprimiert. Weil Cyclooxygenase-2 (COX-2) ebenfalls durch diese Stimulation aktiviert wird, wodurch entzündungsvermittelnde Moleküle, Prostaglandine, erzeugt werden, gibt es eine enge Wechselbeziehung zwischen der Expression von iNOS und COX-2, und so erzeugtes NO beeinflußt auch die Expression von COX-2. Die Erzeugung von NO in Makrophagen wird selektiv durch die Expression von iNOS induziert und induziert so die Aktivierung anderer Entzündungsreaktionen. Daher ist NO ein wichtiger Faktor von Entzündungskrankheiten.

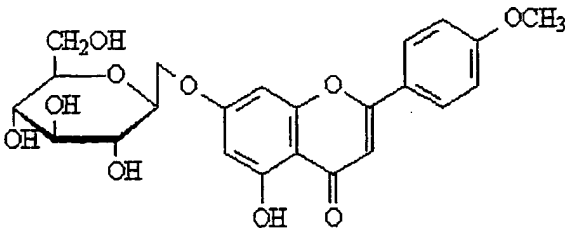
[0008] Atherosklerose ist eine Krankheit, wobei die Arterien verhärtet werden, verursacht durch genetische Bedingungen im Zusammenhang mit Lipidmetabolismus und Umweltbedingungen, wie beispielsweise Eßgewohnheiten, Rauchen und Mangel an Bewegung, und sie kann zu Krankheiten des Kreislaufsystems wie einer Herzkrankheit und einer Gefäßkrankheit des Gehirns führen. Eine Hypothese über das frühe Ausbrechen von Atherosklerose ist die Hypothese der „Reaktion-auf-Verletzung" und diese bedeutet, daß die Endothelzellen von Blutgefäßen in der Funktion gestört werden, indem sie als Ergebnis von genetischen Veränderungen, Peroxiden, Bluthochdruck, Glykosurie, Zunahme der Plasmahomocysteinkonzentration sowie mikrobieller Infektion und dergleichen unfähig sind, normale Homöostase aufrecht zu erhalten. Wenn die Endothelzellen von Blutgefäßen in der Funktion gestört werden, wird die Expression von Zelladhäsionsmolekülen hoch, die Zelltransmission nimmt zu und dann beginnen die Adhäsion von Immunozyten, Plättchen und Fett und die Transmission zu dem Gewebe zuzunehmen. Entzündungsreaktionen wie beispielsweise die Sekretion eines entzündungsvermittelnden Faktors und eines Wachstumsfaktors des Immunozyten führen zur Erzeugung von atherosklerotischen Läsionen. Wobei als Ergebnis von Oxidation, Saccharidbindung, Akkumulation und Glycoproteinbindung Lipoprotein niederer Dichte (LDL) im Blut zu modifiziertem LDL (MLDL) wird, welches Stimuli und Schädigung der Endothelzellen von Blutgefäßen und glatten Muskeln induziert. Deswegen wird, wenn die Expression von VCAM-1 auf den Endothelzellen und die Freisetzung von entzündungsvermittelndem Faktor von Entzündungszellen gefördert werden, LDL fließen gelassen und unter den Endothelzellen akkumuliert, und akkumuliertes LDL und oxidiertes MLDL wiederholen den Prozeß der Induzierung von Einfließen und Aktivierung von Immunozyten wie beispielsweise Makrophagen, T-Lymphozyt und dergleichen und infolgedessen wird die Entzündung der Läsion gefördert. Danach wird der Flecken von Makrophagen, eingeflossen in die Läsion, und Hydrolase, freigesetzt von Lymphozyt, entzündungsvermittelndem Faktor und Wachstumsfaktor, nekrotisiert. Durch die sich wiederholenden Prozesse des Einfließens von Monozyten in die Region des nekrotisierten Fokus, Bewegung und Differenzierung des glatten Muskels ebenso wie Bildung von Fasergeweben wächst das Läsionsgewebe in eine komplexe Struktur von Fasergeweben, bedeckt mit fibroiden Materialien, in nekrotischem Gewebe mit MLDL als Kernteil. Ein Thrombus wird aus dem gewachsenen Läsionsgewebe erzeugt, Arterien werden verhärtet und Krankheiten des Kreislaufsystems wie beispielsweise Behinderung des Blutflusses treten auf. Daher tritt Atherosklerose auf, wenn die Menge von Fett, wie beispielsweise Cholesterin und LDL, im Blut hoch ist, aber sie tritt nicht einfach durch Akkumulation von Fett auf. Vielmehr ist Atherosklerose eine typische Entzündungsreaktion, insofern als Endothelzellen, Makrophagen und Lymphozyten in Wechselbeziehung mit einer Serie von Prozessen des Einfließens und der Akkumulation von Fett unter die Endothelzellen von Arterien, des Fortschreitens der Läsion danach und schließlich der Zellnekrose stehen.

[0009] Agastache rucosa ist eine ausdauernde Pflanze, welche zu der Familie Labiatae gehört und in Nordostasien, das Korea, Japan, China und so weiter einschließt, verbreitet ist. In Korea wächst sie meist wild im südlichen Gebiet oder wird in einigen Gebieten kultiviert. In der chinesischen Medizin wird der in der Luft befindliche Teil dieser Pflanze Patcholi (ein anderer Name von Agastache rugosa) genannt und ein chinesisches Buch „Myoneubyoluk" sagt, daß „sie durch Konfiguration des Bodens schlechte Energie aus unserem Körper und Toxin entfernt und Cholera aestiva heilt, das heißt, eine Krankheit im Inneren und Darmkrämpfe heilt". Bei den gewöhnlichen Leuten wird das Blatt als Geschmacksmaterial in verschiedenen Suppen wie beispielsweise Schmerlesuppe verwendet und wird die Blüte als Honigquelle verwendet.

[0010] Die Untersuchung der Komponenten von Agastache rucosa berichtet, daß es Arten von essentiellem Öl, Sesquiterpen, Diterpen, Triterpen, Flavonoid, Phenylpropanoid und Carotenoid gibt. Die Untersuchung der physiologischen Aktivität von Agastache rucosa berichtet über antibakterielle Aktivität des Extrakts [Phytother. Res. 14 (3), 210–212, 2000; J. Food Sci. Nutr. 4 (2), 97–102, 1999], antivirale Aktivität [Arch. Pharm. Res. 22 (5), 520–523, 1999; US-Patentschrift 5776462] und inhibitorische Aktivität gegen Monoaminoxidase [The Pharmaceutical Society of Korea 42 (6), 634–638, 1998]. Und ebenfalls antibakterielle [Zhongguo Yaozue Zazhi 35 (1), 9–11, 2000; Weishengwuxue Zazhi 18 (4), 1–4, 16, 1998] und Moskitovermeidungsaktivität von essentiel-

lem Öl [Chinesische Patentschrift 1044205], gegen Krebs gerichtete Aktivität von Carotenoid [The Korean Society of Pharmacognosy 30 (4), 404–408, 1999], gegen Krebs gerichtete [7. Nat. Prod. 58 (11) 1718–1821, 1995] und antivirale Aktivität von Diterpen [Arch. Pharm. Res. 22 (1), 75–77, 1999] und antivirale Aktivität von Phenylpropanoid [Arch. Pharm. Res. 22 (5), 520–523, 1999], Antioxidations-[The Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology 42 (3), 262–266, 1999] und Antikomplementaktivität [The Korean Society of Pharmacognosy 27 (1), 20–25, 1996; The Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology 39 (2), 147–152, 1996] sind berichtet worden. Jedoch gibt es noch keinen Bericht über eine Untersuchung, weder über entzündungshemmende noch über antiatherosklerotische Aktivität, eines Extrakts von Agastache rugosa weder im In- noch im Ausland.

[0011] Andererseits ist berichtet worden, daß Tilianin in verschiedenen Pflanzen als Glucose-Glycosid-Verbindung von Acacetin, einem der Flavonoide, vorhanden ist.



[0012] Die Untersuchung über physiologische Aktivität von Tilianin berichtet über Antioxidationsaktivität [J. Food Sci. Nutr. 4 (1999), 221–225; Indian J. Chem., Sect. B; Org. Chem. Incl. Med. Chem. 36B (1997), 1201–1203] und keine inhibitorische Aktivität von Xanthinoxidase [J. Nat. Prod. 51 (1988), 345–348]. Aber noch gibt es weder im In- noch im Ausland einen Bericht über die Untersuchung zu der entzündungshemmenden und antiatherosklerotischen Aktivität von Tilianin.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Daher haben die Erfinder die entzündungshemmende und antiatherosklerotische Aktivität von Arzneimitteln natürlichen Ursprungs, die für Nahrungsmittel- und medizinische Zwecke verwendet werden, untersucht, um natürliche Arzneimittel auszuwählen, die normalen Lipidmetabolismus nicht behindern und imstande sind, das Fortschreiten von atherosklerotischen Läsionen, verursacht durch entzündungshemmende Aktivität, zu bekämpfen. Infolgedessen wurde die vorliegende Erfindung durch die Erkenntnis vervollständigt, daß der Extrakt von Agastache rucosa inhibitorische Aktivität gegen verschiedene Entzündungsfaktoren und ausgezeichnete antiatherosklerotische Aktivität hat, die atherosklerotische Läsionen, signifikant mit Entzündungsreaktionen verbunden, vermindert.

[0014] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher, einen Extrakt der in der Luft befindlichen Teile von Agastache rugosa, erhalten daraus durch Trennungsreinigung, bereitzustellen, welcher als Arzneimittel und Nahrungsmittelzusatzstoffe zum Verhindern ebenso wie zum Behandeln von Entzündungskrankheiten, Atherosklerose, welche mit Entzündungsreaktionen verbunden ist, und Krankheiten des Kreislaufsystems aufgrund von Atherosklerose wirksam ist, weil sie entzündungshemmende Aktivität und antiatherosklerotische Aktivität haben.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0015] Fig. 1 zeigt die dosisabhängige Wirkung von Tilianin auf die Endothelmolekülinduktion. HUVECs wurden mit 10 oder 100 μM Tilianin für 2 Stunden präinkubiert und mit TNF-α (10 ng/ml) für 16 Stunden stimuliert, für VCAM-1- oder Isotyp-Kontrolle gefärbt und durch Fließzytometrie analysiert.

[0016] Fig. 2 zeigt die Wirkung von Agastache-rucosa-Extrakt auf atherosklerotische Läsionen in mit Ölrot O gefärbten Aortenklappenläsionsbereichen von Ldlr-/-Mäusen, gefüttert mit einer Cholesterindiät für 8 Wochen. Repräsentative Querschnitte von Aortenklappen (× 100) in Herzen von (A) der Kontrollgruppe und (B) der Gruppe mit 1%-Agastachea-rucosa-Extrakt-Diät.

[0017] Fig. 3 zeigt die immunchemische Färbung der Makrophagenakkumulation von Aortenklappenläsionen (× 100) von (A) der Kontrollgruppe und (B) der Gruppe mit 1%-Agastache-rugosa-Extrakt-Diät in den Ldlr-/-Mäusen, gefüttert mit einer Cholesterindiät für 8 Wochen, durch Verwendung des monoklonalen Antikörpers für Mäusemakrophagen-2 (MOMA-2, Serotec Inc. NC, USA).

[0018] Fig. 4 zeigt die Wirkung von Tilianin auf atherosklerotische Läsionen in Aortenklappenläsionsbereichen von Ldlr-/-Mäusen, gefüttert mit einer Cholesterindiät für 8 Wochen. Repräsentative Querschnitte von Aortenklappen (× 40) in Herzen von (A) der Kontrollgruppe und (B) der Gruppe mit 1%-Agastache-rucosa-Extrakt-Diät.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0019] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, welche eine entzündungshemmende und antiatherosklerotische Aktivität hat, wobei sie einen Extrakt von Agastache rugosa, erhalten daraus durch Trennungsreinigung, als Wirkstoff umfaßt.

[0020] Die vorliegende Erfindung wird wie folgt in größerer Ausführlichkeit beschrieben.

[0021] Der Extrakt der an der Luft befindlichen Teile von Agastache rugosa, erhalten durch Trennungsreinigung, gemäß der vorliegenden Erfindung hat eine inhibitorische Aktivität von Entzündungsfaktoren, d.h. eine Antikomplementaktivität, eine inhibitorische Aktivität gegen die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 und eine inhibitorische Aktivität gegen die Erzeugung von NO, so ist er wirksam zur Verhinderung und Behandlung von nicht nur Entzündungskrankheiten sondern auch Atherosklerose, zurückzuführen auf seine ausgezeichnete inhibitorische Aktivität gegen atherosklerotische Läsion, verbunden mit Entzündungsreaktionen.

[0022] Daher schließt die vorliegende Erfindung Arzneimittel oder Nahrungsmittelzusatzstoffe, umfassend einen Extrakt von Agastache rugosa, erhalten durch Trennungsreinigung, als Wirkstoff ein.

[0023] Das Verfahren der Trennungsreinigung von Extrakten von Agastache rugosa gemäß der vorliegenden Erfindung wird nachstehend in größerer Ausführlichkeit beschrieben.

[0024] Der Extrakt von Agastache rugosa wird durch Trocknen der ganzen Pflanze von Agastache rugosa, Extrahieren mit minderwertigem Alkohol und nachfolgende Einengung erhalten. Die Fraktionsausbeute des Extrakts beträgt etwa 10 bis 20 Gew.-% der getrockneten Agastache rugosa. Der so erhaltene Extrakt von Agastache rugosa wird in Wasser suspendiert, nach ausreichendem Schütteln durch n-Hexan des gleichen Volumens fraktioniert und durch Chloroform und minderwertigen Alkohol, hinzugegeben in dieser Reihenfolge, fraktioniert, und dann werden die Fraktionen durch Lösungsmittel erhalten. Hier ist minderwertiger Alkohol Alkylalkohol mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, wünschenswerterweise n-Butanol. Das Fraktionsverfahren durch Lösungsmittel wird einem herkömmlichen Verfahren wie beispielsweise Säulenchromatographie mit Silicagel und Hochgeschwindigkeitsflüssigchromatographie unterworfen. Oder es kann ein allgemeines Trennungsreinigungsverfahren wie beispielsweise Umkristallisation verwendet werden.

[0025] Antikomplementaktivität gegen das Komplementsystem, inhibitorische Aktivität gegen ICAM-1-Expression, inhibitorische Aktivität gegen VCAM-1-Expression und inhibitorische Aktivität gegen NO-Erzeugung sowie entzündungshemmende Aktivität und inhibitorische Aktivität von atherosklerotischer Läsion bei Mäusen mit Carrageenan-induzierter akuter Entzündung wurden jeweils in dem Extrakt von Agastache rugosa, erhalten wie vorstehend erwähnt, und Tilianin, erhalten durch Trennungsreinigung, untersucht.

[0026] Der Extrakt von Agastache rugosa hat anti-Komplement-Aktivität, welche die Komplementaktivierung von humanem Serum gegen den Immunkomplex stark hemmt. Und er hemmt stark die Expression von ICAM-1 gegen monozytische leukämische THP-1-Zellen (THP-1-Zellen), welche ICAM-1-Expression durch den Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) induzieren. Und er hat eine starke inhibitorische Aktivität gegen NO-Erzeugung von Mäuse-Monozyt/Makrophagen-RAW264.7-Zellen, welche durch Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert wurden. Außerdem zeigt er starke entzündungshemmende Aktivität bei Mäusen mit Carrageenan-induzierter akuter Entzündung und wenn Mäuse, denen die Rezeptoren für Lipoprotein niederer Dichte fehlen (LDLR-/-Mäuse), mit 1% eines Extrakts von Agastache rugosa, hinzugefügt zu dem Futter, gefüttert werden, verminderte sich eine atherosklerotische Läsion im Aortensinus der Kontrollgruppe bemerkenswert.

[0027] Darüber hinaus wurde bestätigt, daß die Hexanfraktion des Extrakts von Agastache rugosa starke anti-Komplement-Aktivität wie vorstehend beschrieben und inhibitorische Aktivität gegen ICAM-1-Expression hat, die Chloroformfraktion starke inhibitorische Aktivität gegen ICAM-1-Expression und inhibitorische Aktivität gegen NO-Erzeugung hat und die Butanolfraktion starke inhibitorische Aktivität gegen ICAM-1-Expression hat.

[0028] Inzwischen stimmt das Verfahren zum Herstellen von Arzneimitteln und Nahrungsmittelzusatzstoffen mit einem bekannten Verfahren überein, weil die vorliegende Erfindung Arzneimittel und Nahrungsmittelzu-

satzstoffe, umfassend den Extrakt von Agastache rugosa, erhalten durch Trennungsreinigung, als Wirkstoff einschließt.

[0029] Die Extrakte von Agastache rugosa können für sich allein genommen verwendet werden, weil sie die natürliche Form sind, aber sie können auch zu Pulver, Körnchen, Kapsel oder Injektion hergestellt werden, gemischt mit Trägem, Formungsmitteln und Verdünnungsmitteln, die pharmazeutisch gestattet sind. Außerdem ist der Extrakt von Agastache rugosa seit alten Zeiten für Nahrungsmittel und Arzneimittel verwendet worden und die Dosierung ist nicht begrenzt und kann entsprechend der internen Absorptionsfähigkeit, dem Gewicht, Alter des Patienten, Geschlecht, Gesundheitszustand, Verabreichungszeit, Verabreichungsverfahren, Exkretionsverhältnis und Grad der Krankheit variiert werden. Im allgemeinen beträgt die wünschenswerte Menge des Extrakts von Agastache rugosa (konzentrierter Zustand) als Wirkstoff 0,1100 mg/kg (Gewicht). Daher muß die Zusammensetzung, umfassend Wirkstoffe der vorliegenden Erfindung, unter Berücksichtigung von Grenzen signifikanter Dosierung hergestellt werden und spezialisierte Verabreichung wird verwendet oder mehrere Male mit Intervallen bei Notwendigkeit wie beispielsweise Entscheidung eines Beobachters oder eines Experten und Anforderung jeder Einzelperson ausgeführt.

[0030] Inzwischen kann der Extrakt von Agastache rugosa, wenn er als Nahrungsmittelzusatzstoff hergestellt wird, in Lebensmittel wie beispielsweise Getränke, Gummisorten, Gebäck usw. eingeschlossen werden.

[0031] Arzneimittel und Nahrungsmittelzusatzstoffe, umfassend den Extrakt von Agastache rugosa als Wirkstoffe wie vorstehend beschrieben, sind ausgezeichnet beim Verhindern und Heilen von Entzündungskrankheiten, Atherosklerose und Krankheiten des Kreislaufsystems aufgrund von Atherosklerose.

[0032] Die vorliegende Erfindung wird nachstehend unter Verwendung der folgenden Beispiele (die Referenzbeispiele einschließen, die nicht in den Bereich der Patentansprüche fallen) ausführlich erklärt, jedoch soll der Bereich der vorliegenden Erfindung nicht durch die folgenden Beispiele begrenzt werden.

HERSTELLUNGSBEISPIEL 1: HERSTELLUNG DES EXTRAKTS AUS AGASTACHE RUGOSA UND DER FRAKTION DURCH LÖSUNGSMITTEL

[0033] Nach dem Sammeln, Trocknen und Feinschneiden wurden 30 kg des in der Luft befindlichen Teils von Agastache rugosa, kultiviert in der Farm, für 3 Tage mit Methanol (120 l) gehalten. Und der Extrakt (3,5 kg) wurde durch dreimaliges Einengen des Extrakts (30 kg) erhalten. Etwas Extrakt (2,5 kg) wurde dann in Wasser (10 l) suspendiert und zweimal mit n-Hexan (10 l) fraktioniert. Als Ergebnis wurden 380 g n-Hexanfraktion erhalten. Anschließend wurde sie durch Chloroform und n-Butanol wie vorstehend erwähnt fraktioniert und eingeengt. Als Ergebnis wurden 590 g Chloroformfraktion, 450 g n-Butanolfraktion und 980 g Wasserfraktion erhalten.

HERSTELLUNGSBEISPIEL 2: TRENNUNGSREINIGUNG VON TILIANIN AUS AGASTACHE RUGOSA

[0034] Dreißig kg Material wurden nach dem Sammeln, Trocknen und Feinschneiden des in der Luft befindlichen Teils von Agastache rugosa, kultiviert in der Farm, erhalten. Es wurde für 3 Tage mit Methanol (120 l) gehalten, und der Extrakt (3,5 kg) wurde durch 3 Mal Extrahieren davon (30 kg) erhalten.

[0035] Etwas (2,5 kg) von dem Extrakt wurde dann in Wasser (10 l) suspendiert, mit Chloroform (10 l) fraktioniert und durch zweimaliges Wiederholen der Prozedur wurde die Chloroformfraktion entfernt. Anschließend wurde wie bei dem vorstehend erwähnten Verfahren mit n-Butanol fraktioniert und 450 g n-Butanolfraktion wurden erhalten. Die n-Butanolfraktion (150 g), adsorbiert auf Silicagel (1 kg), wurde der Säulenchromatographie (25 × 75 cm), gefüllt mit Silicagel (4 kg), unterworfen und dann wurde die Tilianin umfassende Fraktion unter Verwendung eines Chloroform-Methanol-Gemisches (Methanolanteil: 5%~10%) eluiert. Die verbliebene Fraktion (300 g) wurde mit Methanol (10 l) gehalten und der hier gewonnene Niederschlag wurde mehrere Male mit Methanol gewaschen und der mehr als 90% Tilianin enthaltende Niederschlag wurde erhalten. Reines Tilianin, gewonnen durch zwei vorstehend erwähnte Verfahren, trennte sich von Tilianin enthaltender Verbindung unter Verwendung von Hochgeschwindigkeitsflüssigchromatographie.

BEISPIEL 1: ANTI-KOMPLEMENT-AKTIVITÄT

[0036] Die Messung der Anti-Komplement-Aktivität des Komplementsystems wurde durch ein modifiziertes Verfahren, verwendet von Meyer et al. [Kabat, E. A., und Mayer, M. M., (1961) in „Experimental Immunochemistry" („Experimentelle Immunchemie"), 2. Aufl., Hrsg. Charles und Thomas, USA], ausgeführt und das Ver-

fahren des Experiments ist wie folgt.

[0037] Frische rote Blutzellen vom Schaf wurden mit Gelatine-Veronal-Pufferlösung (1,8 mM Natriumbarbiturat, 3,1 mM Barbitursäure, 0,1% Gelatine, 0,141 M Salz, 0,3% Natriumazid, 0,5 mM Magnesiumchlorid, 0,15 mM Calciumchlorid, pH 7,3) dreimal gewaschen und dann auf die Konzentration der Zellenzahl 5×10^8/ml eingestellt. Antikörper (Kaninchen-Antiseren gegen das Stroma roter Blutzellen vom Schaf, S-1389, Sigma) wurde in der vorstehend erwähnten Pufferlösung auf 1/100 verdünnt, mit der verdünnten Lösung von Schafblutzellen mit dem gleichen Volumen gemischt, im 37°C-Inkubator für 1 Stunde langsam gerührt und sensibilisierte Erythrozyten (EA) wurden hergestellt, welche zweimal mit kalter Pufferlösung gewaschen wurden, wobei die Konzentration auf die Zellenzahl 5×10^8/ml eingestellt wurde. Komplement (Serum), gewonnen aus menschlichem Blut nach Zentrifugation mit 2500 × g, wurde in einer Pufferlösung auf 1/90 verdünnt, mit 40 µl EA-Lösung, 80 µl verdünnter Lösung des Komplements und 80 µl Pufferlösung gemischt und zur Reaktion in einen 37°C-Inkubator gegeben. Und dann wurde für 100 µl der oberen Lösung nach der Zentrifugation sofort die Extinktion bei 504 nm gemessen. Die Extinktion jedes Antikörpers und Komplements (Serum) entsprechend der Konzentration wurde gemessen und die verdünnte Konzentration von Antikörper und Serum (Komplement) zum Ausbruch von 50% Hämolyse (Standardhämolyse) wurde bestimmt. Anschließend wurden Proben zum Test, aufgelöst in DMSO, in 80 µl einer Pufferlösung auf 2,5% verdünnt, was zur Standardhämolyse hinzugegeben wurde, und dann wurde die Messung der Extinktion dreimal wiederholt, und die Abnahme der Extinktion wurde berechnet. Dann wurde unter Verwendung dieser Berechnung die inhibitorische Aktivität gegen Hämolyse von Proben zum Test in anti-Komplement-Aktivität umgewandelt.

$$\textit{Hämolyse-Index (\%)} = \frac{\textit{Hämolyse-Extinktion der Probengruppe} - \textit{Extinktion nur der Probe}}{\textit{maximale Hämolyse-Extinktion der Reaktionslösung} - \textit{Reaktion nur der Reaktionslösung}} \times 100$$

$$\textit{Aktivität des anti-Komplements (\%)} = \frac{\textit{Hämolyse-Index der Probengruppe}}{\textit{Hämolyse-Index des Standards}} \times 100$$

[0038] Als Ergebnis zeigten die n-Hexanfraktion und die Chloroformfraktion des Extrakts von Agastache rugosa hohe anti-Komplement-Aktivität, wie in Tabelle 1 angegeben ist.

TABELLE 1

Proben	Konzentration (µl/ml)	Aktivität des anti-Komplements (%)
Extrakt von *Agastache rugosa*	125	95,6 ± 1,1
	62,5	63,8 ± 2,0
	32	62,7 ± 5,4
n-Hexanfraktion	125	100,7 ± 0,2
	62,5	99,7 ± 0,1
	32	98,5 ± 0,3
Chloroformfraktion	125	100,4 ± 1,2
	62,5	100,2 ± 0,1
	32	60,2 ± 0,9
n-Butanolfraktion	125	49,8 ± 1,1
	62,5	26,3 ± 2,7
	32	1,3 ± 1,8

BEISPIEL 2: INHIBITORISCHE AKTIVITÄT GEGEN ICAM-1-EXPRESSION

[0039] Das folgende ist das Verfahren des Experiments zur inhibitorischen Aktivität gegen ICAM-1-Expression für THP-1-Zellen.

[0040] THP-1-Zellen wurden im CO_2-Inkubator (5% CO_2, 95% relative Feuchtigkeit, 37°C) unter Verwendung von RPMI-1640-Brühe (RPMI-1640, Gibco BRL 23400-021, 1,62%; 0,2% $NaHCO_3$; 1% antimikrobielle Mittel mit Penicillin und Streptomycin gemischt) mit 10% fetalem Rinderserum (Gibco BRL 26140-079, FBS), hinzugegeben zu dem Kulturmedium, kultiviert. Proben zum Test wurden in DMSO aufgelöst, mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) auf unter 5% verdünnt und mit 5% zur Reaktionslösung hinzugegeben, um die Konzentration von DMSO mit darin aufgelösten Proben einzustellen, damit sie in der finalen Lösung 0,25% nicht überschreiten. 200 µl von THP-1-Zellen ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden in jede Vertiefung von 96 Vertiefungen mit Zugabe von 10 µl Lösung, hergestellt mit konstanter Konzentration, verteilt. Nach dem Kultivieren im 37°C-CO_2-Inkubator für 1 Stunde wurde TNF-α (finale Konzentration: 10 ng/ml) hinzugegeben, um ICAM-1-Expression zu induzieren, und es wurde im CO_2-Inkubator für 16 weitere Stunden kultiviert. Die Reaktionslösung wurde hergestellt, um nichtspezifischen Bindungsteil zu isolieren, indem 25 µl Glutaraldehyd-Pufferlösung (Glutaraldehyd 2,08% in PBS) hinzugefügt wurden, um Zellen in der Vertiefung zu verfestigen, gewaschen wurde mit PBST (0,005% Tween-20 in PBS) und hinzugefügt wurden 3% Magermilch. Nachdem wieder gewaschen worden war, wurden primärer Antikörper (anti-humanes ICAM-1) und sekundärer Antikörper (anti-Mäuse-IgG-Peroxidase-Konjugat) der Reihe nach hinzugegeben, 200 µl Substratlösung zum Färben (OPD-Peroxidase-Substrat (Sigma P-9187) in 0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer)) wurden hinzugegeben und dann wurden 50 µl 3 M HCl nach 5~10 Minuten hinzugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Dann wurde das Inhibitionsverhältnis der Expression durch die Proben nach dem Messen der Extinktion bei 490 nm und die ICAM-1-Expression von THP-1-Zellen durch TNF-α berechnet.

$$\textit{Wert der ICAM-1-Expression} = \frac{\textit{Extinktion der TNF-α-Gruppe – Extinktion von nichtspezifischer Bindung}}{\textit{Extinktion der Kontrollgruppe – Extinktion von nichtspezifischer Bindung}}$$

$$\textit{Inhibitionsverhältnis der ICAM-1-Expression (\%)} = \left(1 - \frac{\textit{Mittelwert der ICAM-1-Expression der Probengruppe}}{\textit{Mittelwert der ICAM-1-Expression der Kontrollgruppe}}\right) \times 100$$

TABELLE 2

Probe	Konzentration (µg/ml)	Inhibitorische Aktivität der ICAM-1-Expression (%)
Extrakt von *Agastache rugosa*	25	12,3 ± 2,7
	50	18,4 ± 3,2
n-Hexanfraktion	25	17,4 ± 2,3
	50	41,4 ± 4,2
Chloroformfraktion	25	12,0 ± 12,6
	50	37,1 ± 1,5
Butanolfraktion	25	13,9 ± 3,3
	50	21,4 ± 4,6
Tilianin	25	29,8 ± 2,9
	50	32,7 ± 3,7
Dexamethason*	30 µM	40,1 ± 1,7
*: Positive Kontrolle		

[0041] Wie in Tabelle 2 angegeben war die inhibitorische Aktivität gegen die ICAM-1-Expression des Extrakts von Agastache rugosa, der Lösungsmittelfraktion davon und die von Tilianin niedriger als die von Dexamethason, bekannt als entzündungshemmendes Mittel, aber besonders die n-Hexanfraktion und die Chloroformfraktion zeigen ausgezeichnete inhibitorische Aktivität. Wenn auch Dexamethason eine ausgezeichnete Wirkung als Steroidmittel hat, werden Nebenwirkungen (Funktionsstörung der Niere, Zunahme der Entzündung, Glykosurie, Kontraktion des Muskels, Wachstumshemmung, Osteoporose usw.) bei diesem Mittel wie bei beliebigen anderen Steroidmitteln zum langen Gebrauch gefunden. Aber der Extrakt von Agastache rugosa und Tilianin sind frei von diesen Nebenwirkungen.

BEISPIEL 3: INHIBITORISCHE AKTIVITÄT GEGEN VCAM-1-EXPRESSION

[0042] Das Verfahren des Experiments zu der inhibitorischen Aktivität gegen VCAM-1-Expression von humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVECs) ist wie folgt.

[0043] HUVECs wurden im CO_2-Inkubator (5% CO_2, 95% relative Feuchtigkeit, 37°C) unter Verwendung von EGM-2 BulletKit-Brühe [Kit, welcher eine 500-ml-Flasche von Endothelial Cell Basal Medium-2 (Endothelzellgrundmedium-2) (EBM-2, Clonetics CC-3156, MD, USA) enthält] mit hinzugefügten 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Proben zum Test wurden in DMSO aufgelöst, deren Konzentration in der finalen Reaktionslösung unter 0,1% bleiben soll. HUVECs wurden so viel wie zwei Kulturschalen (ψ 10 cm, 2 × 10^6 Zellen) für jede Gruppe verwendet und die Brühe wurde vor der Behandlung der Proben ausgetauscht. Zuerst wurde Tilianin mit der finalen Konzentration von 100 µM und 10 µM für 2 Stunden vorbehandelt. Dann wurde TNF-α behandelt, um 10 ng/ml für jede Gruppe zu werden, und für 16 Stunden wurde VCAM-1-Expression induziert. Nachdem die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 5 Minuten trypsinisiert (0,025%) worden waren, wurden sie gesammelt. Nachdem die gesammelten Zellen in 15-ml-Röhrchen zentrifugiert worden waren, wurde die obere Lösung entfernt, die Zellniederschläge wurden mit PBS suspendiert und die Zellen wurden wieder zentrifugiert und gewaschen. Nachdem die Zellen zweimal mit PBS gewaschen worden waren, wurden sie in 100 µl PBS mit hinzugefügten 0,5% BSA (Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)) suspendiert und antihumaner monoklonaler Antikörper von Mäusen (Rb 1/9; 1 µg/ml) wurde hinzugegeben. Nachdem der monoklonale Antikörper induziert worden war, mit Zellen auf Eis für 30 Minuten zu konjugieren, wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen und in Eis mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) inkubiert, welches mit Ziegen-F(ab')2-anti-Mäuse-IgG bei einer Verdünnung von 1:25 (W/W) in PBS für 40 Minuten konjugiert wird. Die Zellen wurden dann mit 1% Paraformaldehyd fixiert und durch FACScan (Bio-Rad, USA) analysiert, um die inhibitorische Aktivität gegen VCAM-1-Expression durch Proben zum Test zu messen.

$$\text{Inhibitionsverhältnis der VCAM-1-Expression (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Mittelwert der Fluoreszenzintensität der Probengruppe}}{\text{Mittelwert der Fluoreszenzintensität der Kontrollgruppe}}\right) \times 100$$

[0044] Angegeben in Tabelle 3 und Fig. 1 ist die inhibitorische Aktivität gegen VCAM-1-Expression für eine Gruppe von HUVECs, behandelt mit Tilianin, und es wurde starke Inhibition gegen VCAM-1-Expression bestätigt.

TABELLE 3

Klassifikation	Kontrollgruppe	Gruppe mit 10 µM Tilianin	Gruppe mit 100 µM Tilianin
Mittlere Intensität (Relative Intensität)	113	91	84
Inhibitionsverhältnis der VCAM-1-Expression (%)	-	19,5	25,7

BEISPIEL 4: INHIBITORISCHE AKTIVITÄT GEGEN NO-ERZEUGUNG

[0045] Das Verfahren des Experiments zur inhibitorischen Aktivität gegen NO-Erzeugung von Mäuse-Monozyten/Makrophagen-Zellen RAW264.7 (RAW264.7-Zellen), deren Aktivierung durch Lipopolysaccharid indu-

ziert wird, ist wie folgt.

[0046] Das Experiment wurde unter Verwendung des modifizierten Verfahrens von Sherman et al. (Sherman et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, 1301–1308, 1993) ausgeführt. Die Erzeugung von NO_3, einem stabilen Oxid von NO, und das Inhibitionsverhältnis der Erzeugung durch die Proben wurden für RAW264.7-Zellen gemessen. RAW264.7-Zellen wurden für 48 Stunden im CO_2-Inkubator (5% CO_2, 95% relative Feuchtigkeit, 37°C) inkubiert, nachdem LPS (10 µg/ml) zu RAW264.7-Zellen, welche in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco BRL, USA, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 10% FBS, 6 g/l HEPES, 3,7 g/l $NaHCO_3$) kultiviert waren, hinzugefügt und Aktivierung induziert worden war. Dann wurden 100 µl Griess-Reagenz (37,5 mM Sulfanilsäure, 12,5 mM N-(1-Naphthyl)ethylendiamin-Dihydrochlorid, 6,5 mM Chlorwasserstoffsäure) zu der oberen Lösung hinzugefügt, welche aus dem Zentrifugieren (1000 U/min, 10 Minuten) des Mediums gewonnen wurde, und es wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert und dann wurde die Extinktion durch Spektrophotometer bei 540 nm gemessen. Die NO_3-Konzentration, erzeugt von RAW264.7-Zellen, wurde unter Verwendung des Korrelationskoeffizienten von NO_3-Konzentration-Extinktion, erhalten von Nitrat, hergestellt in 0–50 µM, berechnet. Proben zum Test wurden in DMSO aufgelöst und zu RAW264.7-Zellen 2 Stunden vor der Behandlung von LPS mit 0,1% hinzugegeben, und dann wurde das Inhibitionsverhältnis der NO_3-Erzeugung durch die Proben durch Messen der NO_3-Konzentration nach der Reaktion berechnet.

Standardgleichung der NO-Konzentration = Extinktion (540 nm) x 179,4215–8,5221

$$\textit{Inhibitionsverhältnis der NO-Erzeugung (\%)} = \frac{\textit{Mittelwert der NO-Konzentration der Probengruppe}}{\textit{Mittelwert der NO-Konzentration der Lipidgruppe}} \times 100$$

[0047] Als Ergebnis wurde die hohe inhibitorische Aktivität gegen NO-Erzeugung in dem Extrakt von Agastache rugosa, in der Chloroformfraktion und n-Butanolfraktion gefunden, wie in Tabelle 4 angegeben ist.

TABELLE 4

Probe	Behandlung (µg/ml)	NO-Produkt (nM)	Inhibitionsrate der NO-Erzeugung (%)
Kontrolle	-	4,35±1,6	-
LPS	-	26,9±4,2	-
LPS + Extrakt von *Agastache rugosa*	50	17,1±3,4	43,6*
	100	13,7±2,1	58,7*
LPS + *n*-Hexanfraktion	50	24,7±7,9	9,8
	100	13,7±4,3	58,7*
LPS + Chloroformfraktion	50	14,0±1,1	57,3**
	100	8,9±3,4	80,0**
LPS + *n*-Butanolfraktion	50	24,2±4,2	12,0
	100	13,6±0,2	59,1**
**: P<0,01, *: P<0,05			

BEISPIEL 5: ENTZÜNDUNGSHEMMENDE AKTIVITÄT DES MODELLS VON CARRAGEENAN-INDUZIERTER AKUTER ENTZÜNDUNG

[0048] Männliche Sprague-Dawley-Ratten (210~220 g) wurden als Versuchstiere verwendet, Carrageenan wurde als Entzündungsmittel verwendet und das Inhibitionsverhältnis von Ödem gegen Proben zum Test wurde für ein Ödem-induziertes Modell untersucht. Das folgende ist das Verfahren des Experiments.

[0049] 200 mg/kg des Extrakts von Agastache rugosa, suspendiert in Wasser, als Probe zum Test wurden an jede Maus verfüttert und eine Stunde später wurden 0,1 ml von 1%iger Carrageenan-Suspension in 0,85%iger

Kochsalzlösung unter die Hypodermis nahe den Hinterbeinen verabreicht. Die Dicke der Sohlen der Modelle bei 7 Mäusen/Gruppe wurde für 5 Stunden nach der Verabreichung jede Stunde gemessen. Wobei die Dicke der Sohlen der Modelle in der Kontrollgruppe (Kochsalzlösung) gemeinsam gemessen wurde und das Inhibitionsverhältnis des Ödems der Probengruppe entsprechend der Zunahme des Ödems der Kontrollgruppe abhängig von der Zeit untersucht wurde.

$$\textit{Inhibitionsverhältnis von Ödem (\%)} = 1 - \frac{\textit{Mittelwert der Zunahme der Sohlendicke in der Probengruppe}}{\textit{Mittelwert der Zunahme der Sohlendicke in der Kontrollgruppe}} \times 100$$

[0050] Tabelle 5 zeigt die entzündungshemmende Aktivität der Extrakte von Agastache rugosa in dem Modell der Carrageenan-induzierten akuten Entzündung. Die Extrakte von Agastache rugosa zeigten starke entzündungshemmende Aktivität von 2 Stunden nach der Verabreichung an und die Inhibitionswirkung gegen Ödem dauerte für 5 Stunden der Messung an.

TABELLE 5

Probe	Zeit nach der Behandlung (Stunden)	Ödemvolumen (%)	Inhibitionsrate des Ödems (%)
Extrakte von *Agastache rugosa* (200 mg/kg, p.o.)	0	100	-
	1	100	-
	2	45,8	54,2**
	3	63,4	36,6*
	4	60,8	39,2*
	5	68,4	31,6*
**: P<0,01, *: P<0,05			

BEISPIEL 6: INHIBITORISCHE AKTIVITÄT GEGEN ATHEROSKLEROTISCHE LÄSION

[0051] Das Verfahren des Experiments zur inhibitorischen Aktivität von atherosklerotischer Läsion ist ausführlich beschrieben wie folgt.

Schritt I) Züchten von Mäusen und Experiment zur Verabreichung des Extrakts von Agastache rugosa an die Mäuse

[0052] Die Modelle zur Verwendung, weibliche LDLR-/-Mäuse (6~8 Wochen, durchschnittliches Gewicht 16,8 g), wurden statistisch in zwei Gruppen von jeweils 10 aufgeteilt. Eine Gruppe wurde mit einer Diät mit hohem Cholesteringehalt (15% Fett, 1,25% Cholesterin, 0,5% Na-cholat) gefüttert und die andere Gruppe wurde mit der vorstehenden Diät, gemischt mit einem Zusatz von 0,1% und 1% der Probe zum Test, gefüttert. Während des Experiments hatten die Mäuse freien Zugang zu Wasser und Futter.

Schritt II) Messung der atherosklerotischen Läsion bei Modellen

[0053] Nach 8 Wochen des Experiments wurde das Blut von allen Mäusen durch die Augen gesammelt. Dann wurde PBS (Phosphorus Buffer Solution (Phosphorpufferlösung)) durch das Herz und die Arterie der Mäuse für 10 Minuten fließen gelassen und anschließend wurde Paraformaldehyd für 5 Minuten hindurchfließen gelassen. Nach diesem Prozeß wurden das Herz und die Arterie herausgerissen, für 24 Stunden in 10%iges neutrales Formalin eingetaucht, in OCT-Medium (10,24% Polyvinylalkohol, 4,26% Polyethylenglycol, 80,5% nichtreaktiver Bestandteil, Gew./Gew., Life Science International, England, UK) eingebettet und dann bei –70°C gehalten. Sechs gefrorene Schnitte (jeweils 9 µm), hergestellt, beginnend von dem Bereich der Arterie, unter Verwendung eines Mikrotoms, das niedrige Temperatur (–20°C) aufrechterhält, wurden mit Ölrot O gefärbt und mit Harris-Hämatoxylin gegengefärbt. Diese gefärbten Schnitte wurden dann durch Computer-unterstützte Morphometrie quantifiziert und die mittlere Läsionsgröße wurde für jede Tiergruppe berechnet. In dieser Weise wurde die inhibitorische Aktivität gegen die Läsion der Probengruppe entsprechend dem Ausbruch der Läsion

der Kontrollgruppe berechnet.

$$\textit{Inhibitionsverhältnis von Ödem (\%)} = 1 - \frac{\textit{Mittlere Größe der Läsion der Probengruppe}}{\textit{Mittlere Größe der Läsion der Kontrollgruppe}} \times 100$$

(wobei Kontrollgruppe Gruppe mit Diät mit hohem Cholesteringehalt bedeutet)

(1) Das Ergebnis des Experiments zur inhibitorischen Aktivität gegen atherosklerotische Läsion in der Agastache-rugosa-Gruppe

[0054] Wie in Tabelle 6 gezeigt gab es keine Veränderung in der Menge von Aufnahme und Gewicht in der Agastache-rugosa-Gruppe für 8 Wochen des Experiments, verglichen mit der Kontrollgruppe.

TABELLE 6

Gruppe des Modells	Gewicht (g)		
	0 Wochen	4 Wochen	8 Wochen
Kontrollgruppe	16,8 ± 1,2	19,8 ± 1,4	21,1 ± 1,6
Gruppe mit 1% Extrakt von *Agastache rugosa*	16,6 ± 1,1	19,7 ± 1,1	20,8 ± 1,8

[0055] Außerdem zeigt, wie in Tabelle 7 angegeben, das Ergebnis der Wirkung auf die Inhibition gegen atherosklerotische Läsion des Extrakts von Agastache rugosa an, daß die Läsionsgröße der Gruppe, gefüttert mit einer Diät, einschließend 0,1% und 1% Extrakte von Agastache rugosa, um 23% bzw. 46,6%, verglichen mit der Kontrollgruppe, vermindert wurde.

TABELLE 7

Probe	Konzentration (%)	Läsionsgröße (μm^2)	inhibitorische Aktivität (%)
Kontrollgruppe	-	304644,0 ± 76602,6	-
Gruppe mit Extrakt von *Agastache rugosa*	0,1	232120,3 ± 32534,04	23,8
	1,0	162629,6 ± 28362,1	46,6*
*: P<0,01			

[0056] Und wenn der Querschnitt der Arterie des Herzens gefärbt wurde, zeigte die Größe der Läsion (nekrotisches Gewebe) aufgrund von Entzündung eine signifikante Abnahme in der Gruppe mit 1% Extrakt von Agastache rugosa im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Fig. 2). Und wenn nur Makrophagen der Läsion gefärbt wurden, zeigte die Akkumulation von Makrophagen eine signifikante Abnahme in der Gruppe mit 1% Extrakt von Agastache rugosa im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Fig. 3).

[0057] Daher zeigt das Fortschreiten der atherosklerotischen Läsion, die zu Akkumulation und Entzündung von Immunozyten wie beispielsweise Makrophagen unter Endothelzellen wächst, daß der Extrakt von Agastache rugosa signifikant die Entwicklung der Läsion aufgrund von Entzündung vermindert.

(2) Das Ergebnis des Experiments zur inhibitorischen Aktivität gegen atherosklerotische Läsion in der Tilianin-Gruppe

[0058] Wie in Tabelle 8 angegeben zeigt das Ergebnis der Auswirkung auf die Inhibition gegen atherosklero-

tische Läsion von Tilianin an, daß die Läsionsgröße der Gruppe, gefüttert mit einer 1% Tilianin einschließenden Diät, im Vergleich zu der Kontrollgruppe um 41,9% vermindert wurde.

TABELLE 8

Probe	Konzentration (%)	Läsionsgröße (μm^2)	inhibitorische Aktivität (%)
Kontrollgruppe	-	592981,4 ± 98784,2	-
Tilianin	1,0	344277,7 ± 186833,8	41,9**
Lovastatin*	1,0	291442,0 ± 96927,8	50,9***
*: positive Kontrolle, **: P<0,003, ***: P<0,0002			

[0059] Wie in Tabelle 8 angegeben war die inhibitorische Aktivität gegen atherosklerotische Läsion in der Gruppe mit 1% Lovastatin höher als in der Gruppe mit 1% Tilianin, aber Tilianin gemäß der vorliegenden Erfindung ist sicher ohne Nebenwirkung, während Lovastatin eine toxische Wirkung auf die Leber hat. Außerdem wurde festgestellt, daß die Tilianin-Gruppe gemäß der vorliegenden Erfindung viel wirksamer als die Kontrollgruppe ist.

[0060] Und das Ergebnis der Färbung des Querschnitts der Arterie des Herzens zeigte, daß die Größe der Läsion (nekrotisches Gewebe), verursacht durch die Entzündungsreaktion, in der Gruppe mit 1% Tilianin im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant vermindert war (**Fig. 4**). Daher wurde in dem Fortschreiten der atherosklerotischen Läsion, die zu Akkumulation und Entzündung von Immunozyten wie beispielsweise Makrophagen unter Endothelzellzellen wächst, bestätigt, daß Tilianin die Entwicklung von atherosklerotischer Läsion signifikant vermindert.

BEISPIEL 7: HERSTELLUNG VON TABLETTEN

[0061] Tabletten wurden nach dem Zerkleinern und Mischen von 10 g des Extrakts von Agastache rugosa (einschließend 1 g Tilianin), 70 g Lactose, 15 g kristalliner Cellulose und 5 g Magnesiumstearat durch das direkte Tablettierungsverfahren hergestellt. Die Gesamtmenge jeder Tablette betrug 100 mg und die Menge des Extrakts von Agastache rugosa als Wirkstoff betrug 10 mg (1 mg Tilianin).

BEISPIEL 8: HERSTELLUNG VON PULVERN

[0062] Pulver wurde durch Zerkleinern und Mischen von 10 g des Extrakts von Agastache rugosa (einschließend 1 g Tilianin), 50 g Maisstärke und 40 g Carboxycellulose hergestellt. Und Kapseln wurden hergestellt, indem 100 mg Pulver in Kapseln mit der Härte VI gegeben wurden.

BEISPIEL 9: TEST DER TOXIZITÄT

[0063] Seit alten Zeiten waren der Extrakt von Agastache rugosa und Tilianin, erhalten durch Trennungsreinigung, nichttoxische Materialien und natürliche Arzneien, die als Nahrungsmittel und Arzneien verwendet wurden. 1 g/kg der Komponente, gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) und verdünnt in Wasser, wurde an jede Maus (10 Mäuse/Gruppe) verabreicht und nach 7 Tagen wurde gefunden, daß keine Maus tot war.

BEISPIEL 10: BESTANDTEIL FÜR EIN GETRÄNK, DAS DEN EXTRAKT VON AGASTACHE RUGOSA EINSCHLIEßT

[0064] Pflaumenextrakt (fester Pflaumenextrakt (Feststoffanteil 69°Bx), Hersteller: Hadong National Agricultural Cooperative Federation in Korea), eine chinesische Quitte, eine Angelica gigas Nakai, ein getrockneter Ingwer, Maximowiczia chinensis, ein Zimt (Kyongdong Market (Kyongdong-Markt), Seoul), Traubensaft (Feststoffanteil 65°Bx, Hersteller: Comax International Corp.) und Birnensaft (Hersteller: Hanmi Aromatics Chemistry) wurden als Bestandteile für ein Getränk hergestellt, das den Extrakt von Agastache rugosa einschließt.

[0065] Zuerst wurden natürliche Arzneien wie beispielsweise eine chinesische Quitte, eine Angelica gigas

Nakai, ein getrockneter Ingwer, eine Maximowiczia chinensis und ein Zimt hydrothermisch bei 100°C für 30 Minuten extrahiert, nachdem Wasser mit dem zehnfachen Gewicht jeder natürlichen Arznei hinzugefügt worden war. Diese wurden bei 4°C für 24 Stunden gehalten und nach dem Zentrifugieren für 10 Minuten wurde der Extrakt einer natürlichen Arznei aus der oberen Lösung verwendet.

[0066] Außerdem wurde der Pflaumenextrakt verwendet, wobei der feste Pflaumenextrakt (69°Bx) auf 10°Bx verdünnt wurde, der Traubensaft (65°Bx) und der Birnensaft (69°Bx) wurden unverdünnt verwendet.

[0067] Für Bestandteile für ein Getränk, das den Extrakt von Agastache rugosa einschließt, wurden 0,1% Extrakt von Agastache rugosa, 0,2% Pflaumenextrakt, 0,3% des Extrakts von getrocknetem Ingwer. 0,3% des Extrakts von chinesischer Quitte, 0,01% des Extrakts von Zimt, 5,0% Birnensaft und 17% Superfructose in Wasser verdünnt, um 100 ml einzustellen, bestrahlt und bei 95°C für 15 Sekunden behandelt, um Waren vom Getränketyp herzustellen.

[0068] In dem vorstehenden wird das Verfahren zur Herstellung der Waren vom Getränketyp, die den Extrakt von Agastache rugosa einschließen, erwähnt, aber die Getränkewaren für die Gesundheit, die Tilianin anstatt des Extrakts von Agastache rugosa mit dem gleichen Zweck einschließen, könnten hergestellt werden.

[0069] Wie vorstehend erwähnt hemmen der Extrakt von Agastache rugosa und Tilianin, erhalten durch Trennungsreinigung, gemäß der vorliegenden Erfindung Aktivierung, Erzeugung und Expression verschiedener Entzündungsfaktoren, haben die entzündungshemmende Aktivität bei Tieren und signifikante inhibitorische Aktivität gegen die Erzeugung von atherosklerotischer Läsion, daher sind sie als Arzneimittel oder Nahrungsmittelzusatzstoffe zum Verhindern oder Behandeln von Entzündungskrankheiten, Atherosklerose, welche mit Entzündungsreaktionen verbunden ist, und einer Krankheit des Kreislaufsystems aufgrund von Atherosklerose verwendbar.

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen Extrakt von Agastache rugosa als Wirkstoff, wobei der Extrakt durch Extrahieren des in der Luft befindlichen Teils von Agastache rugosa unter Verwendung eines Alkylalkohols mit von 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Einengen und dann Suspendieren des so erhaltenen Alkoholextrakts in Wasser und dann Fraktionieren der Wasser/Alkohol-Extrakt-Suspension mit einem Lösungsmittel, ausgewählt aus n-Hexan, Chloroform und einem Alkylalkohol mit von 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, um den gewünschten Extrakt von Agastache rugosa zu ergeben, erhältlich ist.

2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der Alkylalkohol mit von 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, verwendet, um den in der Luft befindlichen Teil von Agastache rugosa zu extrahieren, n-Butanol ist.

3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Wasser/Extrakt-Suspension mit einem Lösungsmittel, ausgewählt aus n-Hexan, Chloroform und n-Butanol, fraktioniert wird.

4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Wasser/Extrakt-Suspension mit n-Hexan fraktioniert wird.

5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Wasser/Extrakt-Suspension mit Chloroform fraktioniert wird.

6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Wasser/Extrakt-Suspension mit n-Butanol fraktioniert wird.

7. Nahrungsmittelzusatzstoffzusammensetzung, umfassend einen Extrakt von Agastache rugosa als Wirkstoff wobei der Extrakt durch Extrahieren des in der Luft befindlichen Teils von Agastache rugosa unter Verwendung eines Alkylalkohols mit von 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Einengen und dann Suspendieren des so erhaltenen Alkoholextrakts in Wasser und dann Fraktionieren der Wasser/Alkohol-Extrakt-Suspension mit einem Lösungsmittel, ausgewählt aus n-Hexan, Chloroform und einem Alkylalkohol mit von 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, um den gewünschten Extrakt von Agastache rugosa zu ergeben, erhältlich ist.

8. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 bei der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung einer Entzündungskrankheit.

9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die Entzündungskrankheit durch das Komplementsystem verursacht wird.

10. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die Entzündungskrankheit durch die Expression von interzellulärem Adhäsionsmolekül-1 verursacht wird.

11. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die Entzündungskrankheit durch die Erzeugung von Stickstoffoxid verursacht wird.

12. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 bei der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung einer Atherosklerose.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Atherosklerose durch das Komplementsystem verursacht wird.

14. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Atherosklerose durch die Expression von interzellulärem Adhäsionsmolekül-1 verursacht wird.

15. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Atherosklerose durch die Erzeugung von Stickstoffoxid verursacht wird.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig.1

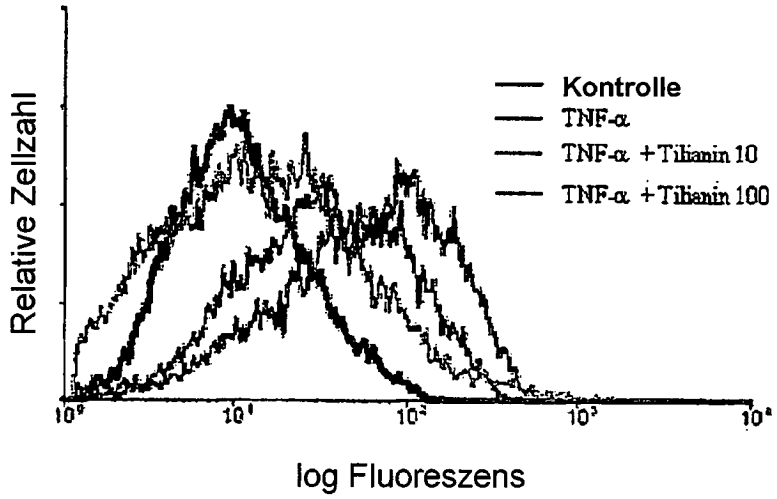
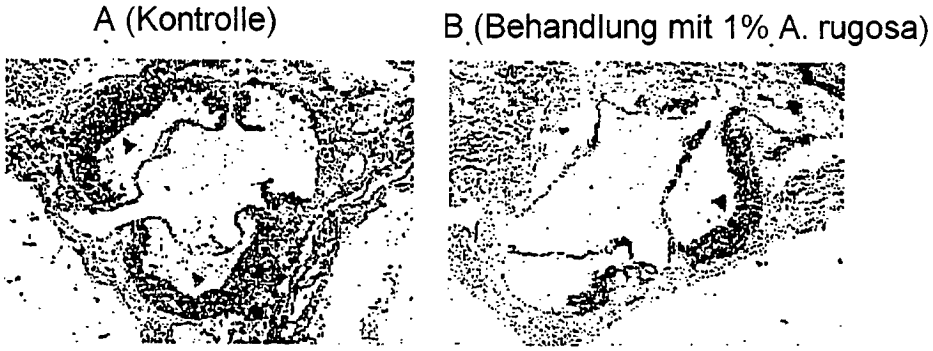


Fig. 2



Gewebe von Läsionen unter vaskulären Endothelzellen (rote Region)

Fig. 3

A (Kontrolle) B (Behandlung mit 1% A. rugosa)



rote Region: Region von akkumulierten Makrophagen

Fig. 4

A (Kontrolle) B (Behandlung mit 1% A. rugosa)

