

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 873**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2007 E 07721208 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2025339**

54 Título: **Disolución acuosa de composición farmacéutica de 20(R)-ginsenósido Rg3 y procedimiento de la misma**

30 Prioridad:

22.05.2006 CN 200610046617

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.07.2014

73 Titular/es:

**DALIAN FUSHENG NATURAL MEDICINE
DEVELOPMENT CO., LTD. (100.0%)
5 Tieshan Mid-road Economic and Technological
Development Zone Dalian
116600 Liaoning, CN**

72 Inventor/es:

**LIU, HONG;
LU, MINGMING;
LU, QI;
CUI, WANZHE y
CHO, SEONG TAE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 477 873 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

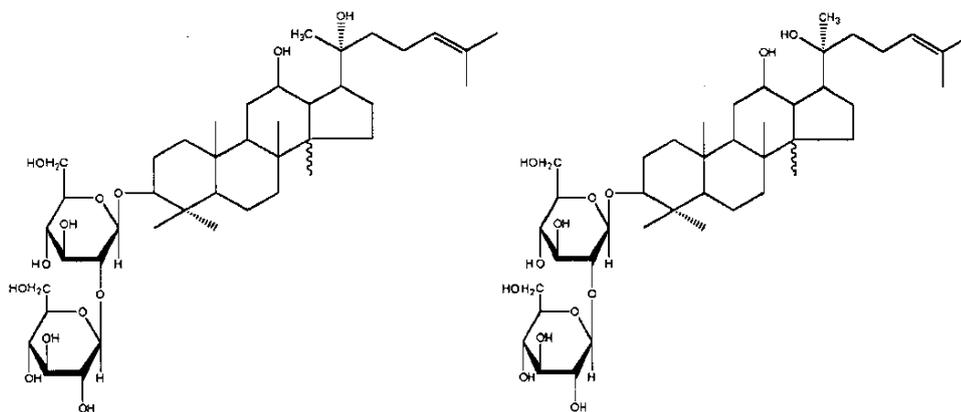
Disolución acuosa de composición farmacéutica de 20(R)-ginsenósido Rg3 y procedimiento de la misma

Campo tecnológico de la invención:

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica de ginsenósido Rg3 y procedimiento de la misma, como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes tecnológicos de la invención:

El ginsenósido Rg3 es un compuesto de saponina de triterpeno tetracíclico que existe en ginseng, con un peso molecular de 784,13. Hay dos isómeros ópticos para el ginsenósido Rg3, es decir, 20(R)-ginsenósido Rg3 y 20(S)-ginsenósido Rg3. El 20(R)-ginsenósido Rg3 es químicamente estable e insoluble en agua, mientras que el 20(S)-ginsenósido Rg3 es químicamente inestable y fácilmente soluble en agua. Sus estructuras moleculares son las siguientes:



La estructura molecular de 20(R)-ginsenósido Rg3 La estructura molecular de 20(S)-ginsenósido Rg3

Se encuentra que 20(R)-ginsenósido Rg3 tiene fuertes actividades inhibitoras y antimetastásicas para el tumor. Como el 20(R)-ginsenósido Rg3 es insoluble en agua, la biodisponibilidad de sus preparaciones orales es muy baja, que limita enormemente el cumplimiento de su eficacia clínica y su vía de administración parenteral.

Para disolver el 20(R)-ginsenósido Rg3 en agua se han explorado algunos estudios, tales como "Ginsenoside Rg3 hydroxypropyl- β -cyclodextrin clathrate, preparations and its processes" (solicitud n^o: 01119929.6), que se publicó en el boletín de patentes el 29 de enero de 2003 como CN1393484 A. El contenido principal de la patente es el siguiente: clatrato de ginsenósido Rg3 - hidroxipropil- β -ciclodextrina con una relación de peso de material de partida de ginsenósido:hidroxipropil- β -ciclodextrina =1:1~200. El procedimiento de preparación es el siguiente: (1) disolver el ginsenósido Rg3 en disolvente orgánico; (2) disolver la hidroxipropil- β -ciclodextrina en agua; (3) añadir gota a gota la disolución de ginsenósido a la disolución de hidroxipropil- β -ciclodextrina, con agitación vigorosa; después de eso continuar la agitación de la mezcla durante otras 2~24 horas. Filtrar la mezcla con una membrana de filtración de microporos de 0,45 μ m, condensar el filtrado, eliminar el disolvente orgánico, redissolver en agua para inyección y luego filtrar el filtrado de nuevo con una membrana de filtración de microporos de 0,22 μ m, liofilizar el filtrado para conseguir un polvo blanco poroso, es decir, el clatrato de ginsenósido.

Las desventajas del procedimiento son las siguientes: (1) en el procedimiento de preparación del clatrato, cuando el reactante (disolución de reactante) se recircula a un tercio de su volumen original, todavía se detecta algún residuo del disolvente orgánico; sin embargo, es ineficaz eliminar el disolvente orgánico residual por liofilización. Por tanto, es muy difícil cumplir la especificación del disolvente residual en una disolución para inyección cuando se prepara con este polvo de clatrato. (2) En el procedimiento de preparación del clatrato, el disolvente residual es muy útil para formar un clatrato soluble de ginsenósido Rg3 e hidroxipropil- β -ciclodextrina, con una relación de 1:1~200. Si el disolvente residual se elimina completamente, no se formará clatrato estable bajo el intervalo de relación anteriormente mencionado y el ginsenósido Rg3 se separará inmediatamente como sedimento del clatrato acuoso, quedando el clatrato inadecuado para la preparación de disolución para inyección. (3) El ginsenósido Rg3 no podría transformarse en el clatrato completamente con este procedimiento, y la tasa de utilización de Rg3 es solo del 86 %. Por tanto, el coste de producción para preparar la disolución para inyección aumentará obviamente.

El documento CN 1569012 A desvela disoluciones para inyección que comprenden ginsenósido Rg3, disolvente y aditivos.

5 Contenido de la invención

Los objetivos de la presente invención son proporcionar un procedimiento de preparación y el uso medicinal para la composición farmacéutica de 20(R)-ginsenósido Rg3 y sus preparaciones farmacéuticas, con características de bajo coste de producción y fácil absorción (alta biodisponibilidad) del cuerpo humano.

El material de partida principal (por brevedad, material principal) de la presente invención es 20(R)-ginsenósido Rg3 y el material adyuvante (por brevedad, adyuvante) de la presente invención está compuesto por clase A y clase B. La clase A incluye ácido desoxicólico (sodio), dodecilsulfato de sodio (SDS) y arginina; la clase B es ciclodextrinas que incluyen ① ciclodextrina y sus derivados, tales como micropartícula a escala nanométrica de ciclodextrina polimerizada, ciclodextrina polimerizada y ciclodextrina con cadena lateral; ② β-ciclodextrina y sus derivados, tales como β-ciclodextrina, 2,6-dimetil-β-ciclodextrina, glucosil-β-ciclodextrina, β-ciclodextrina basada en nanotecnología, β-ciclodextrina de éter sulfobutílico, metil-β-ciclodextrina y β-ciclodextrina metilada no localizada; ③ hidroxipropil-β-ciclodextrina y sus derivados, tales como 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina, derivados de 3-hidroxipropil-β-ciclodextrina, 2,3-dihidroxipropil-β-ciclodextrina y 2,3,6-trihidroxipropil-β-ciclodextrina; ④ hidroxietil-β-ciclodextrina; ⑤ mezcla de adyuvantes de ciclodextrina y sus derivados, es decir, la mezcla mezclada con diferentes combinaciones de ciclodextrina anteriormente mencionada, β-ciclodextrina, hidroxipropil-β-ciclodextrina, hidroxietil-β-ciclodextrina y sus derivados.

La relación de peso del material principal con respecto a los materiales adyuvantes es la siguiente:

20(R)-ginsenósido Rg3: adyuvante A o B ①, ②, ⑤ = 1:1~300; 20(R)-ginsenósido Rg3: adyuvante B ③, ④ = 1:100~400.

Procedimiento de preparación de la composición farmacéutica de 20(R)-ginsenósido Rg3:

(1) Preparación de la disolución del material principal: Disolver el 20(R)-ginsenósido Rg3 en una mezcla de disolventes orgánicos para preparar una disolución al 0,1~5,0 % de ginsenósido. El nombre y proporción de los disolventes orgánicos mezclados son los siguientes: 1) cloroformo: acetato de etilo: etanol (metanol): agua = 10~25:30~45:18~30:5~15, nivel inferior; 2) cloroformo: etanol (metanol): agua = 70~60:40~30:10, nivel inferior; 3) etanol: agua = 90~95: 10~5; 4) metanol: agua = 85~90:15~10; 5) acetonitrilo: agua = 40~60:60~40; 6) diclorometano: etanol (metanol): agua = 60~65:40~35:10; 7) acetonitrilo: etanol (metanol) = 70~80:30~20; 8) sulfóxido de dimetilo: agua = 90~80:10~20; 9) propilenglicol: etanol (metanol): Tween 80: agua = 40~50:10~20:1:49~29.

(2) Preparación de la disolución de material adyuvante: 1) Disolver el adyuvante de clase A y clase B anteriormente mencionado en agua individualmente para preparar una disolución acuosa al 0,1~30 % (a); 2) Disolver el adyuvante del subgrupo de clase B ③ y ④ anteriormente mencionado en agua individualmente para preparar una disolución acuosa al 20~65 % (b).

(3) Añadir disolución del material principal en disolución de adyuvante: 1) directamente añadir la disolución de ginsenósido anteriormente mencionada en la disolución de adyuvante (a) a 40~100 °C y agitar la mezcla durante 0,3~1 hora, y luego obtener una disolución transparente. o 2) Añadir gota a gota la disolución de ginsenósido anteriormente mencionada a una velocidad constante en la disolución de adyuvante (b) a 60~100 °C y agitar la disolución acuosa hasta que se contemple el goteo, y entonces se obtiene una disolución transparente.

(4) Recircular el disolvente y preparar la composición farmacéutica: Recircular el disolvente descomprimiendo la disolución transparente en la etapa (3) en un estado próximo a sequedad a aproximadamente 2/3 de su volumen original, con un grado de vacío de 0,01~0,08 MPa, a temperatura de 80~100 °C. Reconstituir la disolución añadiendo agua al volumen original y recircular el disolvente descomprimiendo a casi sequedad; repetir dos veces el procedimiento anteriormente mencionado y finalmente reconstituir el material casi secado añadiendo agua para inyección o agua purificada, y luego mezclar bien para disolver. La disolución acuosa resultante es la composición farmacéutica de 20(R)-ginsenósido Rg3. Para la disolución de la composición preparada a partir de 20(R)-ginsenósido Rg3 y adyuvante de clase A o clase B ①, ② y ⑤, el contenido de material principal es 0,5~10 mg/ml; para la disolución de la composición preparada a partir de 20(R)-ginsenósido Rg3 y el adyuvante clase B ③ y ④ el contenido de material principal es 0,1~2 mg/ml. Tras los procedimientos de secado tal como vacío, pulverización o liofilización, el polvo de composición farmacéutica soluble en agua de 20(R)-ginsenósido Rg3 puede obtenerse, y el procedimiento y las condiciones de secado son las siguientes:

	Método de secado	Condiciones de secado
	Secado al vacío	Temperatura, 30-60°C; Presión, 0.01-0.08MPa, Secado al vacío por 48 horas
5	Secado por aspersión	Se utiliza la tecnología de chorro de avión supersónico 300-990 m/s; Temperatura, 30° - 60°C; Presión, 0.01 - 0.05MPa secado instantáneo a velocidad supersónica
10	Liofilización (congelación secado)	Pre-congelación por 5 horas a -45°C, y liofilización siguiendo un programa de temperatura gradiente:: -45 - -15°C, sublimación secado por 20 horas, y después secado al vacío por 10 horas a -15-30°C.
15		

Con esta composición farmacéutica soluble en agua de 20(R)-ginsenosido Rg3 como material de partida podrían prepararse los siguiente tipos diferentes de preparaciones:

20 1. Preparaciones para administración oral y externa: Para la disolución de la composición de 20(R)-ginsenosido Rg3 obtenida haciendo reaccionar material principal con adyuvante clase A y B puede producirse polvo sólido de ginsenosido Rg3 soluble en agua por procedimiento de secado. Después de formularse con vehículos farmacéuticamente recibibles y procesarse por técnicas farmacéuticas, pueden producirse diferentes tipos de preparaciones, tales como gránulos, comprimidos (comprimido general, comprimido en dispersión, comprimido de liberación retardada, comprimido de liberación controlada, etc.), cápsulas blandas o duras, disolución para administración oral, preparaciones para administración externa (parche, pomada, cuentagotas y aerosol).

25 2. Preparaciones inyectables: Para la disolución de la composición de 20(R)-ginsenosido Rg3 obtenida haciendo reaccionar material principal con adyuvante clase A y clase B ③ y ④: 1) Mezclar uniformemente la disolución acuosa de composición de 20(R)-ginsenosido Rg3 anteriormente mencionada mediante tanto un ultrafiltro como añadiendo 0,1 % (peso) de carbón activo de calidad para inyección medicinal, dejarlo a 80 °C durante 30 minutos, eliminar el pirógeno filtrando con una membrana de filtración de microporos de 0,45 µm. Tras la esterilización mediante una membrana de filtración de microporos de 0,22 µm se obtiene una disolución para inyección. O tras la liofilización se obtiene polvo liofilizado para inyección o polvo para inyección estéril. 2) Secar y recircular el disolvente de la disolución acuosa anteriormente mencionada por tanto liofilización, secado a vacío como pulverización para preparar un polvo sólido de ginsenosido Rg3 estable y soluble en agua. Tras la reconstitución podría producirse el polvo liofilizado para inyección o polvo estéril para inyección.

40 Las preparaciones farmacéuticas preparadas a partir de la composición sólida o líquida farmacéutica de 20(R)-ginsenosido Rg3 anteriormente mencionada tienen las actividad inhibitoras para el crecimiento tumoral y metástasis, y las actividades de potenciación de la eficacia y atenuación de la toxicidad cuando se combinan con la terapia química o radioterapia de tumor, y pueden potenciar funciones inmunitarias humanas, mejorar la memoria humana y resistir la fatiga, y tienen detumescencia, alivio de dolor y efectos de cicatrización.

45 En comparación con la tecnología actual, la presente invención presume de las siguientes ventajas:

50 1. A partir de la disolución de la composición farmacéutica de 20(R)-ginsenosido Rg3 en la presente invención puede obtenerse polvo que está sin disolvente residual orgánico y puede disolverse completamente en agua después de secar; por tanto, el polvo liofilizado para inyección preparado a partir de este polvo puede cumplir las especificaciones de la preparación inyectable en la "Farmacopea de la República Popular China". Y también pueden producirse diferentes tipos de preparaciones para administración oral o externa.

55 2. Las preparaciones inyectables o preparaciones orales preparadas a partir de la composición farmacéutica de 20(R)-ginsenosido Rg3 en la presente invención han mejorado significativamente la biodisponibilidad en comparación con las actuales preparaciones orales comerciales (nombre comercial, cápsula ShenYi). Después de la inyección, la preparación inyectable de ginsenosido Rg3 puede entrar completamente en la sangre de seres humanos y animales, con una biodisponibilidad absoluta del 100 %, que supera 20 ~ 50 veces la biodisponibilidad de las preparaciones orales actuales. Las preparaciones orales de ginsenosido Rg3 superan la biodisponibilidad de las preparaciones orales actuales más de 10 veces.

60 3. El 20(R)-ginsenosido Rg3 producido en la presente invención puede transformarse al 100 % en disolución con adyuvante. Después del procedimiento de secado podría obtenerse polvo liofilizado para inyección; por tanto, la tasa de utilización de material es del 100 %, con un coste significativamente inferior al de para su polvo liofilizado de clatrato para inyección.

65 4. Las preparaciones farmacéuticas orales de la composición de 20(R)-ginsenosido Rg3 producidas en la

presente invención pueden reducirse a la mitad de la dosificación de administración debido a biodisponibilidad mejorada, con la misma eficacia o mejor que la cápsula actual, que disminuye enormemente el coste de tratamiento de pacientes con cáncer.

5 Las preparaciones inyectables de composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 producidas en la presente invención tienen alta distribución de la concentración en el hígado y paredes gastroenterales de las ratas y perros, por tanto, puede usarse como un buen tratamiento para tumores del tubo digestivo y metástasis tumorales.

Ilustración en figuras

10 Se adjuntan 11 figuras en la presente invención.

La **Figura 1** es un cromatograma de determinación de cromatografía líquida de alta resolución de la muestra patrón de 20(R)-ginsenósido Rg3.

15 La **Figura 2** es un cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 y desoxicolato sódico.

La **Figura 3** es un cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución de la muestra patrón de 20(R)-ginsenósido Rg3.

20 La **Figura 4** es un cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 y dodecilsulfato de sodio.

La **Figura 5** es un cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución de la muestra patrón de 20(R)-ginsenósido Rg3.

La **Figura 6** es un cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 y 2,3,6-trihidroxipropil- β -ciclodextrina.

25 La **Figura 7** es un cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución de la muestra patrón de 20(R)-ginsenósido Rg3.

La **Figura 8** es un cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 y β -ciclodextrina.

30 La **Figura 9** es un curva de concentración-tiempo de fármaco en plasma después de la administración por vía oral de 5,6 gramos de gránulos de 20(R)-ginsenósido Rg3 en siete perros.

La **Figura 10** es un curva de concentración-tiempo de fármaco en plasma después de la administración por vía oral de 3 gramos de cápsulas ShenYi de 20(R)-ginsenósido Rg3 en siete perros.

35 La **Figura 11** es un curva de concentración-tiempo de fármaco después de la administración por vía oral de gránulos y cápsulas ShenYi de 20(R)-ginsenósido Rg3 en siete perros.

Modo de operación concreto

Ejemplo de operación 1

40 Disolver 1 gramo de 20(R)-ginsenósido Rg3 con mezcla de disolventes orgánicos (cloroformo: acetato de etilo: etanol: agua = 10:30:18:5, fase inferior) y preparar disolución al 0,1 %. Disolver 100 gramos de desoxicolato sódico en agua para inyección; calentar la disolución a 40 °C y preparar disolución acuosa al 30 %. Añadir la disolución de ginsenósido Rg3 preparada en la disolución de desoxicolato sódico anteriormente mencionada y agitar durante 3 horas, y luego se obtiene una disolución de composición clara. Después de la filtración, la disolución se descomprime en un evaporador rotatorio a 100 °C con un grado de vacío de 0,01 MPa para recircular el disolvente a casi sequedad. Después de reconstituir el material casi seco con agua destilada al volumen original, la disolución se recircula de nuevo a casi sequedad. Repetir el procedimiento anterior una vez más para eliminar completamente el disolvente orgánico. Reconstituir el material casi seco con agua para inyección (100 ml); la disolución acuosa resultante es 100 ml de composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 con desoxicolato sódico. Después de la determinación por cromatografía líquida de alta resolución se calcula que el contenido de ginsenósido Rg3 en la disolución de composición es 10 mg/ml, referido a la Figura 1 y 2.

Ejemplo de operación 2

55 Disolver 0,5 gramos de 20(R)-ginsenósido Rg3 con mezcla de disolventes orgánicos (cloroformo: acetato de etilo: etanol: agua = 25:45:30:15, fase inferior) y preparar disolución al 5 %. Disolver 100 gramos de dodecilsulfato de sodio en agua para inyección; calentar la disolución a 100 °C y preparar disolución acuosa al 0,1 %. Añadir la disolución de ginsenósido Rg3 preparada en la disolución de dodecilsulfato de sodio anteriormente mencionada y agitar durante 0,1 horas y se obtiene una disolución de composición clara. Después de la filtración, la disolución se descomprime en un evaporador rotatorio a 80 °C con un grado de vacío de 0,08 MPa para recircular el disolvente a un cuarto de su volumen original. Después de reconstituir el material casi seco con agua destilada al volumen original, la disolución se recircula de nuevo a casi sequedad. Repetir el procedimiento anteriormente mencionado una vez más para eliminar completamente el disolvente orgánico. Reconstituir el material casi seco con agua purificada (1000 ml); la disolución acuosa resultante es 1000 ml de composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 con dodecilsulfato de sodio. Después de la determinación por cromatografía líquida de alta resolución se calcula que el contenido de ginsenósido Rg3 en la disolución de composición es 0,5 mg/ml, referido a la Figura 3 y 4.

Ejemplo de operación 3 (no según la invención)

5 Disolver 5 gramos de 20(R)-ginsenósido Rg3 con mezcla de disolventes orgánicos (cloroformo: etanol: agua =
70:30:10, fase inferior) y preparar disolución al 0,1 %. Disolver 500 gramos de 2,3,6-trihidroxipropil- β -ciclodextrina en
agua destilada, calentar la disolución a 60 °C y preparar disolución acuosa al 20 %. Mientras se agita, añadir gota a
gota la disolución de ginsenósido Rg3 preparada en la disolución de 2,3,6-trihidroxipropil- β -ciclodextrina
10 anteriormente mencionada a una tasa constante de 10 ml/min y detener la agitación después de que se complete la
adición gota a gota. La disolución se descomprime en un evaporador rotatorio a 100 °C con un grado de vacío de
0,05 MPa para recircular la disolución a casi sequedad. Después de reconstituir el material casi seco con agua
destilada al volumen original, la disolución se recircula de nuevo a casi sequedad. Repetir el procedimiento anterior
una vez más. Reconstituir el material concentrado con 2,5 litros de agua para inyección, y la disolución acuosa
15 resultante es el producto intermedio soluble en agua de 20(R)-ginsenósido Rg3. Después de la determinación por
cromatografía líquida de alta resolución se calcula que el contenido de producto intermedio soluble en agua de
ginsenósido Rg3 es 2 mg/ml, referido a la Figura 5 y 6.

Ejemplo de operación 4 (no según la invención)

20 Disolver 2 gramos de 20(R)-ginsenósido Rg3 con mezcla de disolventes orgánicos (cloroformo: etanol: agua =
70:30:10, fase inferior) y preparar disolución al 5 %. Disolver 600 gramos de β -ciclodextrina en agua destilada,
calentar la disolución a 40 °C y preparar disolución acuosa al 30 %. Mientras se agita, añadir gota a gota la
disolución de ginsenósido Rg3 preparada en la disolución de β -ciclodextrina anteriormente mencionada a una tasa
constante de 5 ml/min y detener la agitación después de que se complete la adición gota a gota. La disolución se
25 descomprime en un evaporador rotatorio a un grado de vacío de 0,04 MPa para recircular el disolvente a casi
sequedad. Después de reconstituir el material casi seco con agua destilada al volumen original, la disolución se
recircula de nuevo a casi sequedad. Repetir el procedimiento anteriormente mencionado una vez más. Reconstituir
el material concentrado con 20 litros de agua para inyección; la disolución acuosa resultante es producto intermedio
soluble en agua de 20(R)-ginsenósido Rg3. Después de la determinación por cromatografía líquida de alta
30 resolución se calcula que el contenido de producto intermedio soluble en agua de ginsenósido Rg3 es 0,1 mg/ml,
referido a la Figura 7 y 8.

35

40

45

50

55

60

65

Ejemplos de operaciones 5-43

Ejemplo de operación	Material Principal (g)	mezcla de disolvente orgánico utilizado para disolver el material principal (ml)	Auxiliar (g)	Concentración de solución auxiliar (%)	Temperatura de reacción para facilitar la disolución (C°)	Tiempo de agitación (hora)	Composición de la solución	
							Material Principal auxiliar	Rg3 (mg/ml)
5	0.2	Chloroform: ethyl acetate: methanol: water=25:45:30:15, lower phase,80	Sodium deoxycholic acid 0.2	0.1	40	0.1	1:1	0.5
6	1	Chloroform: ethyl acetate: methanol: water=25:45:30:15, lower phase,800	Deoxycholic acid 100	10	60	3	1:100	10
7	1	Chloroform: ethyl acetate: methanol: water=25:45:30:15, lower phase,800	Deoxycholic acid 50	30	60	0.5	1:100	10
8	1	Ethanol: water=90: 10, 1000	Sodium dodecylsulphate 5	5	50	2	1:5	5
9	10	Acetonitrile: methanol=70:30,1000	Sodium dodecylsulphate 400	20	55	3	1:40	2
10	5	Acetonitrile: methanol=80:20,500	Sodium dodecylsulphate 100	10	45	1.5	1:20	1
11	1	Dimethyl sulfoxide: water=90:10,50	Arginine 100	20	50	1	1:100	2
12	5	Dimethyl sulfoxide: water=80:20, 250	Arginine 100	25	50	1	1:20	1
13	5	Chloroform: methanol: water=70:30:10, lower phase,5000	Polymerized cyclodextrin nanoscale microparticle 500	30	100	5	1:100	1
14	2	Chloroform: methanol: water=60:40:10, lower phase,200	Polymerized cyclodextrin nanoscale microparticle 200	10	80	2	1:100	2
15	1	Ethanol: water=95: 5, 500	Polymerized cyclodextrin 100	20	65	2.3	1:100	0.5
16	1	Ethanol: water=90: 10, 600	Polymerized cyclodextrin 150	30	85	2.6	1:150	0.8
17	0.5	Methanol: water=90: 10, 250	Side chained cyclodextrin 200	10	100	1	1:200	0.5
18	0.5	Methanol: water=85: 15, 200	Side chained cyclodextrin 300	15	95	0.8	1:300	0.9
19	1	Acetonitrile: water=40: 60, 500	β-cyclodextrin 150	30	65	1.3	1:150	1
20	300	Dimethyl sulfoxide: water=90: 10, 1000	2,6-dimethyl-β-cyclodextrin 3000	30	100	3	1:10	1
21	5	Dimethyl sulfoxide: water=80: 20, 125	2,6-dimethyl-β-cyclodextrin 800	25	95	3	1:160	2
22	1	Acetonitrile: methanol=70: 30, 200	Nano-based β-cyclodextrin,90	0.5	60	0.7	1:90	0.5
23	3	Acetonitrile: methanol=80: 20, 3000	Nano-based β-cyclodextrin,150	30	60	3	1:50	2
24	2	Acetonitrile: ethanol=70: 30, 200	Sulfobutyl ether β-cyclodextrin, 140	25	75	1	1:70	0.5
25	2	Acetonitrile: ethanol=80: 20, 400	Sulfobutyl ether β-cyclodextrin, 180	15	95	3	1:90	1

Ejemplo de operación	Material Principal (g)	mezcla de disolvente orgánico utilizado para disolver el material principal (ml)	Auxiliar (g)	Concentración de solución auxiliar (%)	Temperatura de reacción para facilitar la disolución (C°)	Tiempo de agitación (hora)	Composición de la solución	
							Material Principal auxiliar	Rg3 (mg/ml)
26	1	Propylene glycol: ethanol:Tween 80: water=40:10:1:49, 600	Methylated β-cyclodextrin 300	30	60	2	1:300	0.5
27	1	Propylene glycol: ethanol:Tween 80: water=50:20:1:29, 40	Methylated β-cyclodextrin 150	25	65	1.2	1:150	1
28	1	Propylene glycol: methanol:Tween 80: water=40:10:1:49, 50	Methyl-β-cyclodextrin, non-localized;240	20	100	2.5	1:240	0.5
29	1	Propylene glycol: methanol:Tween 80: water=50:20:1:29, 65	Methyl-β-cyclodextrin, non-localized;300	30	95	1.2	1:300	0.8
30	2	Dichloromethane: methanol: water=65:35:10, lower phase,200	2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin 200	40	60	1.3	1:100	2
31	2	Dichloromethane: methanol: water=60:40:10, lower phase,350	2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin 600	60	65	4.8	1:300	0.1
32	1	Dichloromethane: ethanol: water=65:35:10, lower phase,300	3-hydroxypropyl-β-cyclodextrin 120	65	70	0.9	1:120	2
33	1	Dichloromethane: ethanol: water=60:40:10, lower phase,500	3-hydroxypropyl-β-cyclodextrin 300	65	80	1.3	1:300	0.8
34	2	Chloroform: ethanol: water=70:30:10, lower phase,350	2,3-dihydroxypropyl-β-cyclodextrin 200	50	60	1.5	1:100	1.5
35	2	Chloroform: ethanol: water=60:40:10, lower phase,250	2,3-dihydroxypropyl-β-cyclodextrin 400	50	70	2	1:200	0.6
36	5	Dimethyl sulfoxide: methanol=80: 20, 25	2,3,6-trihydroxypropyl-β-cyclodextrin 500	65	65	1.7	1:100	0.1
37	0.5	Dimethyl sulfoxide: ethanol=90: 10, 30	Hydroxyethyl-β-cyclodextrin 75	30	80	0.45	1:150	0.5
38	0.5	Dimethyl sulfoxide: ethanol=80: 20, 400	Hydroxyethyl-β-cyclodextrin 175	60	85	0.5	1:350	0.2
39	1	Chloroform: ethyl acetate: methanol: water=25:45:30:15, lower phase,500	β-cyclodextrin: 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (1:1)mixture 150	25	60	1.7	1:150	2
40	1	Chloroform: methanol: water=70:30:10, lower phase,330	2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin: 3-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (1:5) mixture 400	20	70	2.6	1:400	1
41	1	Acetonitrile: ethanol=70: 30, 100	Polymerized cyclodextrin nanoscale microparticle:β-cyclodextrin mixture: sulfobutyl ether β-cyclodextrin (1:1:1) mixture 90	50	95	1.4	1:90	0.5

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Ejemplo de operación	Material Principal (g)	mezcla de disolvente orgánico utilizado para disolver el material principal (ml)	Auxiliar (g)	Concentración de solución auxiliar (%)	Temperatura de reacción para facilitar la disolución (C°)	Tiempo de agitación (hora)	Composición de la solución	
							Material Principal auxiliar	Rg3 (mg/ml)
42	2	Dimethyl sulfoxide: methanol =80: 20, 100	2-hydroxypropyl-β- cyclodextrin: 3-hydroxypropyl-β- cyclodextrin: 2,3,6-trihydroxypropyl -β-cyclodextrin (1:5:10) mixture, 480	60	80	1.5	1:240	2
43	0.5	Propylene glycol: ethanol:Tween 80: water=40:10:1:49, 200	B-cyclodextrin: polymerized cyclodextrin: 2-hydroxypropyl-β- cyclodextrin (2:5:5) mixture, 200	45	85	1.1	1:400	2

Los ejemplos 13-43 no corresponden a la invención.

Ejemplo de operación 44

5 Tomar 100 ml de disolución de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 obtenida del Ejemplo de operación 1, añadir agua para inyección hasta 1000 ml y añadir 0,1 gramos de carbón activo de grado para inyección y mezclar a uniformidad. Dejarla a 80 °C durante 30 minutos, eliminar el pirógeno con filtración en membrana de microporos de 0,45 µm, esterilizar con una membrana de filtración de microporos de 0,22 µm bajo condiciones estériles, dispensar en un vial de tubo para antibiótico estéril de 10 ml bajo condiciones estériles, y la cantidad de cada vial de tubo es 4,5~4,9 ml:5 mg. Después de dispensarse, los viales de tubo para antibiótico se tapan a medias con corcho, se transfieren sobre la placa de un liofilizador (LYO-5, fabricado en Shanghai). Cerrar la puerta del liofilizador, encender el liofilizar y primero congelar por debajo de -40 °C y mantener durante 4 horas, y luego empezar el secado a vacío como el siguiente programa de sublimación: -45~-30 °C durante 4 horas, -30~-20 °C durante 4 horas, -20~-15 °C durante 2 horas. Finalmente, secar durante 4 horas a 15~30 °C, y el procedimiento de liofilización está completo.

10 Después de la liofilización, los corchos se ponen completamente y se presionan cubiertas de aluminio con una máquina de sellado. Muestrear algunas muestras para probar. Envasar los viales de tubo cualificados, se obtienen 1000 viales de tubo de polvo liofilizado para inyección (3,1 mg de Rg3/vial). Los procedimientos anteriormente mencionados pueden llevarse a cabo para el Ejemplo de operación 2-40 para producir polvo soluble en agua de ginsenósido Rg3.

Ejemplo de operación 45 (no según la invención)

Tomar 50 litros de disolución de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 obtenida del Ejemplo de operación 20, poner sobre la placa de secado de acero inoxidable de un secador a vacío de giro de conos dual (modelo SZG - 4500, fabricado en Changzhou) para secar a vacío durante 12 horas a 80 °C con un grado de vacío de 1,3 Pa, y obtener polvo soluble en agua; o colocar la disolución de la composición anteriormente mencionada en un desecador de lecho fluidizado de un secador de pulverización combinado (modelo SPG -105, hecho en Changzhou) y verter la disolución de la composición que contiene 20 % de sustancia sólida en el lecho fluidizado por una boquilla de chorro de salida doble, a 20 °C y a una tasa de vertido de 0,8 kg/hora. La temperatura de entrada del gas fluidizado es 150 °C y el volumen vertido puede calentar el lecho fluidizado a 75 °C, y pueden producirse 55 kilogramos de polvo soluble en agua con un diámetro de 100~250 micrómetros. O, el polvo seco soluble en agua anteriormente mencionado puede reconstituirse de nuevo y liofilizarse con un procedimiento descrito en el Ejemplo de operación 35, y pueden obtenerse 10000 viales de polvo liofilizado para inyección.

Ejemplo de operación 46**Un experimento *in vivo* de la mejora de la biodisponibilidad de los gránulos de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3**

40 Concentraciones en plasma de 20(R)-ginsenósido Rg3 en perros Beagle se comparan entre la administración por vía oral de gránulos de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 y cápsulas de material de 20(R)-ginsenósido Rg3. El estudio está contratado con el Laboratorio del Metabolismo y Farmacocinética de Fármacos, Universidad Farmacéutica de Shenyang. Los resultados demuestran que la concentración en plasma de 20(R)-ginsenósido Rg3 en perros Beagle administrados por vía oral con los gránulos de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 es 12 a 45 20 veces superior a en perros administrados por vía oral con cápsulas de material de 20(R)-ginsenósido Rg3, sugiriendo que la biodisponibilidad de los gránulos de la composición de ginsenósido Rg3 en el cuerpo animal es mucho mayor que el de cápsulas hechas del material de ginsenósido Rg3.

Perros Beagle se administran por vía oral con gránulos de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 obtenidos por el Ejemplo de operación 37 y se mide la biodisponibilidad. El instrumento usado para las pruebas de las muestras biológicas es el espectrómetro de masas API 4000. Se usa un procedimiento de espectrometría de masas en tándem con cromatografía de líquidos (EM/CL/EM). La curva de concentración-tiempo de fármaco en plasma en siete perros administrados por vía oral con 5,6 gramos de composición farmacéutica de 20(R)-ginsenósido Rg3 y β-ciclodextrina (1:200, que contiene Rg3 30 mg) se presenta en la Figura 9. La curva de concentración-tiempo de fármaco en plasma en siete perros administrados por vía oral con 3 cápsulas ShenYi (que contiene 30 mg de Rg3, 10 mg de Rg3/cápsula) está en la Figura 10. Las curvas de concentración-tiempo de fármaco en plasma media de estos dos grupos de tratamiento se presentan en la Figura 11. Tras una administración por vía oral de la composición farmacéutica, la concentración observada máxima ($C_{m\acute{a}x}$) es $6,8 \pm 1,8$ ng/ml a $2,3 \pm 0,9$ h ($t_{m\acute{a}x}$ el tiempo para la máxima concentración observada). La semivida terminal ($t_{1/2}$ es $6,0 \pm 0,9$ h y el área bajo la curva (ABC_{0-t}) es $40,0 \pm 15,7$ ng·h/ml.

Ejemplo de operación 47**El bioensayo farmacodinámico antineoplásico de polvo liofilizado de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 para inyección**

1 Fármaco de prueba y procedimiento de preparación

Fármaco de prueba: Polvo liofilizado de ginsenosido Rg3 para inyección; lote: 20030519, especificación 5 mg/vial.

- 5 Procedimiento de preparación: Pesar con exactitud la cantidad requerida de polvo liofilizado de ginsenosido Rg3 para inyección o adyuvante relativo; añadir a ella solución salina, hasta la concentración requerida. El volumen de administración es 0,5 ml/ratón.

2 Materiales experimentales

- 10 **2.1 Disolvente:** solución salina
- 15 **2.2 Controles positivos:** Ciclofosfamida para inyección (CTX), producida por Shanghai Hualian Pharmaceutical Group. Inyección intravenosa una vez al día, continuada durante 7 días. 5-Fluorodesoxiuridina (5Fu) para inyección, producida por Shanghai Xudong Haipu Pharmaceutical Corporation, Ltd. Mitomicina C (MMC) para inyección, producida por Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. (Tokio, Japón).

2.3 Fuente de tumor

- 20 Modelo LOVO de cáncer intestinal humano, modelo MGC de cáncer de estómago humano y modelo QGY de cáncer de hígado humano, todas las cepas tumorales se subcultivan *in vivo* durante más de la 2ª generación. Células B₁₆ de melanoma de ratón se subcultivan y se mantienen por el Departamento de Farmacología del Instituto de Industria Farmacéutica de Shanghai.

3 Animales experimentales**3.1 Fuente**

- 30 Ratones sin pelo se suministran por el Centro de Animales de Laboratorio de Shanghai de la Academia China de Ciencias; el nº de certificado de cualificación es SCXK2003-0003. Ratones C₅₇BL/6 y Kunming se suministran por el Grupo de Animales de Laboratorio del Instituto de Industria Farmacéutica de Shanghai. El nº de licencia de uso de animales de laboratorio es SYXK (Shanghai) 2004-0015.

3.2 Peso corporal

- 35 Ratones sin pelo: 6 semanas; ratones C₅₇BL/6 y Kunming: 18~22 gramos.

3.3 Sexo

- 40 Se usan animales tanto hembra como macho, para cada prueba se usan el mismo sexo de animales.

3.4 Número de animales

- 45 Para los grupos de tratamiento y de control positivos se usan 6 ratones sin pelo y otros 8-10 ratones para cada grupo, para controles negativos se usan 2 grupos de animales.

4 Diseños experimentales**4.1 Sistema de dosificación**

- 50 La dosificación de administración para polvo liofilizado de 20(R)-ginsenosido Rg3 para inyección se fija como 1,5, 0,75 y 0,375 mg/kg/día.

4.2 Protocolo de administración

- 55 Tomar la administración intravenosa dos veces al día. Para modelos de ratón inoculados con modelos y células de tumor humano, continuar la inyección durante siete días; para modelos de ratón inoculados con células tumorales de ratón, continuar la inyección durante cinco días.

4.3 Controles experimentales

- 60 Controles negativos: administrados con el mismo adyuvante que los grupos de tratamiento y el protocolo de administración es el mismo que el de los grupos de tratamiento.
- 65 Controles positivos: CTX, 30 mg/kg; MMC, 2 mg/kg; 5Fu, 30 mg/kg; inyección intraperitoneal o intravenosa, una vez al día, continúa durante 7 días.

5 Procedimientos experimentales

5.1 Bioensayo antineoplásico

5.1.1 Modelo de inoculación *in situ* de estómago

Tomar (células de) cáncer de estómago MGC de la 2ª generación *in vivo* que crecen considerablemente bajo condición estéril y prepararlas en una suspensión de células con una densidad de 2×10^7 células/ml por un procedimiento de homogeneizado. Inyectar 0,05 ml de la suspensión de células en la capa muscular de mayor curvatura del estómago de ratones sin pelo mediante una operación de cirugía. Administrar los ratones anteriores con fármaco de prueba al día siguiente según el protocolo de diseño experimental y calcular el porcentaje de prolongación de la vida del huésped portador del tumor:

Porcentaje de extensión de vida (%) = (días de supervivencia media de grupo de tratamiento / días de supervivencia media de control) x 100 %

5.1.2 Modelo de inoculación *in situ* de hígado

Tomar células tumorales QGY de la 2ª generación *in vivo* que crecen considerablemente bajo condición estéril y prepararlas en una suspensión de células con una densidad de aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/ml por un procedimiento de homogeneizado 1:6. La suspensión de células se filtra con un tamiz de acero inoxidable de 100 de malla y se reserva para uso adicional. Después de la esterilización y anestesia rutinarias de los ratones sin pelo, hacer una incisión en la piel del abdomen por debajo del xifoide del medio de la cavidad abdominal y entonces abrir la cavidad abdominal. Exponer el hígado e inyectar 0,05 ml de suspensión de células en el parénquima del hígado con una jeringuilla de calibre importado de 28 1/2 ml. Después de cerrar la cavidad abdominal, suturar la capa muscular y la capa de piel consecutivamente. Los ratones sin pelo se alojan en un cubículo laminar y el alimentador, lecho, jaula y todos los aparatos de operación están todos esterilizados por autoclave. Administrar el fármaco de prueba al día siguiente según el protocolo de diseño experimental, registrar el tiempo de supervivencia en el plazo de 45 días después de la dosificación para cada grupo y calcular el porcentaje de prolongación de la vida del huésped portador de tumor en comparación con el de controles negativos.

5.2 Bioensayo de potenciación de la eficacia antineoplásica

5.2.1 Modelo de inoculación subcutánea de la axila

Tomar células tumorales que crecen considerablemente bajo condición estéril y prepararlas en una suspensión de células con una densidad de aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/ml por un procedimiento de homogeneizado. Inocular 0,2 ml/ratón de la suspensión de células subcutáneamente en la axila del huésped axilar. Administrar el fármaco de prueba al día siguiente según el protocolo de diseño experimental. Sacrificar cada animal del grupo después de ~3 semanas y extraer el tumor de los ratones y pesarlo. Calcular el porcentaje de inhibición tumoral por la siguiente fórmula:

Porcentaje de inhibición de tumor (%) = [(media de peso de tumor del grupo de control - media de peso de tumor del grupo de tratamiento) / media del peso del tumor del grupo de control] x 100%

5.2.2 Modelo de inoculación de la vena caudal

Células de melanoma de ratón B16 en fase de crecimiento logarítmica se sajan bajo condición estéril y se prepara una suspensión de células con una densidad de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/ml. Inocular 0,2 ml/ratón de suspensión de células en la vena caudal de ratón C₅₇BL/6. Administrar el fármaco de prueba al día siguiente según el protocolo de diseño experimental, sacrificar el animal después de ~3 semanas y extraer los pulmones de los ratones y contar la colonia metastásica en los pulmones de cada ratón. Calcular el porcentaje de inhibición tumoral basado en la colonia media del grupo por la siguiente fórmula:

Porcentaje de inhibición de tumor (%) = [(media de colonia del grupo de control - media de colonia del grupo de tratamiento) / media de colonia del grupo de control] x 100%

5.3 Bioensayo de atenuación de la toxicidad antineoplásica

Se evalúan los efectos del polvo liofilizado de ginsenosido Rg3 para inyección sobre los cambios del número de glóbulos blancos en ratones inducidos por agentes de quimioterapia. Se recoge muestra de sangre de 80 ratones C₅₇BL/6 mediante el plexo venoso ocular y se realiza el recuento de glóbulos blancos para cada ratón por el procedimiento rutinario en cámara de recuento de glóbulos sanguíneos. Se seleccionan ratones con un recuento de glóbulos blancos de 7500 ± 300 y se asignan aleatoriamente en diferentes grupos, 10 ratones para cada grupo. Excepto para el grupo de control de blanco, los animales en otros grupos se administran con 100 mg/kg de CTX *ip*

x2 en el día 0 y 2. Administrar el fármaco de prueba según el protocolo anteriormente mencionado, contar los glóbulos blancos a partir del día 0 y luego contar cada 3 días durante el periodo experimental. Medir cada número de glóbulos blancos de ratones del grupo y calcular el número de glóbulos blancos medio y sus desviaciones estándar para cada grupo en cada momento de tiempo (fecha) hasta que el número de glóbulos blancos de controles positivos se recupere al normal.

5.4 Bioensayo inmunológico

5.4.1 Bioensayo de la actividad de linfocitos NK en ratones C₅₇BL/6 portadores de células de cáncer de pulmón de Lewis

Se prepara suspensión de células de cáncer de pulmón de Lewis bajo condición estéril y 0,05 ml (aproximadamente 1×10^6 células tumorales) de esta suspensión se inoculan subcutáneamente en los dedos del pie de ratones C₅₇BL/6. Los ratones se asignan aleatoriamente al día siguiente a grupos diferentes y se administran con el fármaco de prueba según el protocolo de diseño experimental. Al día siguiente de la última dosificación, los bazo se extraen de los ratones bajo condición estéril y se prepara suspensión de células del bazo con un tamiz de 100 de malla. Los eritrocitos se eliminan por tratamiento hipotónico y la suspensión de células resultante se transfiere a matraz de cultivo celular. Después de incubar a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 1 hora, las células adheridas se sacan y las células se cuentan y se ajustan a una densidad de 3×10^6 /ml y se usan como célula efectora. Las células diana se preparan rutinariamente cultivando células L₉₂₉ *in vitro* durante 24 horas y ajustando la concentración de células a $1,5 \times 10^5$ /ml, y la relación de efectoras con respecto a diana es 20:1. La célula efectora y la célula diana se añaden consecutivamente a placas de cultivo celular de 96 pocillos, haciendo también los controles de célula efectora y célula diana, y se cultivan durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. Se añade la disolución de tinción MTT y las células se cultivan adicionalmente durante 2 horas, después se añade la disolución de digestión y el valor de DO para cada pocillo se mide a la mañana siguiente. Las actividades de linfocitos NK se calculan por la siguiente fórmula:

Actividad de células NK (%) = {[media OD del control objetivo – (media OD grupo de experimento – media OD de células efectoras)] / media OD del control objetivo} x 100 %

5.4.2 Fagocitosis de macrófagos de la cavidad abdominal de ratones Kunming normales

Los ratones Kunming macho se asignan aleatoriamente a diferentes grupos y se administran con el fármaco de prueba según el protocolo de diseño experimental. Después de la última dosificación, 1,5 ml de aminopeptodrato al 0,5 % se inyectan intraperitonealmente en cada ratón. Después de 24 horas, 0,2 ml de 1×10^6 /ml de suspensión de eritrocitos de pollo se inyectan intraperitonealmente en cada ratón. Cuarenta minutos después de la inyección, el fluido intraperitoneal se eluye con solución salina y se recoge, y luego se centrifuga. Los sedimentos precipitados tras la centrifugación se extienden sobre un portaobjetos. Después de la fijación con metanol, tinción con Giemsa y montaje de los portaobjetos, el número de macrófagos que han reabsorbido glóbulos rojos de pollo se cuentan de 100 macrófagos para cada ratón bajo un microscopio de inmersión en aceite, y también se cuenta el número total de glóbulos rojos de pollo reabsorbidos. El porcentaje de fagocitosis y los índices de fagocitosis se calculan por la siguiente fórmula:

Índices de fagocitosis = número total de macrófagos que reabsorben glóbulos rojos de pollo en 100 macrófagos /100 macrófagos

5.4.3 Bioensayo de actividad de IL-2 en ratones C₅₇BL/6 portadores de células de cáncer de pulmón de Lewis

Se usa el procedimiento de ELISA de sándwich de anticuerpos dobles. Recubrir el anticuerpo monoclonal anti-IL-2 de ratón sobre una placa de ELISA y la IL-2 en las muestras o patrones se une con el anticuerpo monoclonal, y los componentes sin unir libres se lavan. Mientras tanto se añaden anticuerpo anti-IL-2 de ratón biotinilado y avidina marcada con peroxidasa de rábano picante y la biotina y la avidina se unen específicamente. El anticuerpo anti-IL-2 de ratón se une con IL-2 que está unida en el anticuerpo monoclonal, y se forma un inmunocomplejo. Los componentes libres se lavan. Después de añadirse los reactivos de coloración, el color cambia a azul y de nuevo se añade disolución de terminación, y el color cambia a amarillo. La DO de la disolución se mide a 450 nm y la concentración de IL-2 está en proporción con DO₄₅₀. Por la curva de calibración podrían obtenerse las concentraciones de IL-2 en las muestras.

6 Resultados experimentales

6.1 Para los resultados de comparación del bioensayo de eficacia antineoplásica con el cáncer de hígado de polvo liofilizado de ginsenósido Rg3 para inyección y cápsulas de Rg3 se refiere a la Tabla 1 y Tabla 2.

6.2 Para los resultados del bioensayo de eficacia antineoplásica para cáncer de intestino y cáncer gástrico de polvo liofilizado de ginsenósido Rg3 para inyección se refiere a la Tabla 3 y Tabla 4.

6.3 Para los resultados del bioensayo de potenciación de la eficacia de quimioterapia de polvo liofilizado de ginsenósido Rg3 para inyección se refiere a la Tabla 5.

6.4 Para los resultados del bioensayo de atenuación de la toxicidad a quimioterapia de polvo liofilizado de

ginsenosido Rg3 para inyección se refiere a la Tabla 6.

6.5 Para los resultados de bioensayo de potenciación de la función inmunitaria de polvo liofilizado de ginsenosido Rg3 para inyección se refiere a la Tabla 7 a Tabla 9.

5 **Tabla 1 El bioensayo de eficacia comparativa entre polvo liofilizado de ginsenosido Rg3 para inyección y cápsulas en el modelo QGY de cáncer de hígado humano (N=3)**

Muestra	Dosis Mg/Kg/d	Protocolo de dosis	Dosis total	Animal Número (iniciación/final)	Peso corporal de animales (g) iniciación	Media de tiempo de supervivencia (d) Media +- SD	Indice de extensión de vida T/C3%
Preparación de inyección de polvo Rg3	1.5	iv314bid	42	6/0	22.3	29.60+-2.4***	135.16
Preparación de inyección de polvo Rg3	0.75	iv314bid	21	6/0	21.7	28.50+-3.3***	130.14
Rg3 cápsulas	3.0	ig314qd	84	6/0	22.0	28.80+-2.8***	131.51
CTX	30	ip37qd	210	6/0	21.7	34.50+-4.0***	157.53
Control negativo	Auxiliar relativo	iv314bid	84	12/0	21.8	21.90+-2.35	

***En comparación con el grupo control negativo, $p < 0,01$. Tasa de prolongar la vida útil $> 125\%$ contaba con antineoplásica eficaz; # El nombre comercial de cápsulas es Shenyi cápsula.

35 **Tabla 2 El bioensayo de eficacia antimetastásica de pulmón comparativo entre polvo liofilizado de ginsenosido Rg3 para inyección y cápsulas en el modelo B16 de melanoma de ratón (N=3)**

Muestra	Dosis Mg/Kg/d	Protocolo de dosis	Dosis total	Animal Número (iniciación/final)	Peso corporal de animales (g) iniciación/final	Colonia de pulmón Media +- SD	Indice antimetastásico%
Preparación de inyección de polvo Rg3	1.5	ivx14bid	42	10/10	20.1/24.7	20.6+6.8***	55.33
Preparación de inyección de polvo Rg3	0.3	ivx14bid	8.4	10/10	19.8/25.3	26.5+-6.1***	42.54
Rg3 cápsulas	6	igx10qd	60	10/10	19.8/24.8	22.8+-6.7***	50.56
Rg3 cápsulas	3	igx10qd	30	10/10	19.9/25.2	27.5+-7.7***	40.37
CTX	100	lpx2qd	200	10/10	19.8/22.6	3.5+-3.7***	92.41
Control negativo	Auxiliar relativo	ivx14bid	42	20/20	19.7/25.3	46.12+-12.46	

*** En comparación con los controles negativos, $p < 0,001$, lo mismo que la siguiente tabla.

Tabla 3 El bioensayo de eficacia de polvo liofilizado de ginsenósido Rg3 para inyección en el modelo LOVO de cáncer de intestino humano (N=3)

Muestra	Dosis Mg/Kg/d	Protocolo de dosis	Animal Número (iniciación/final)	Peso corporal de animales (g) iniciación	Media de supervivencia (d) Media +- SD	Indice de extensión de vida T/Cx%
Preparación de inyección de polvo Rg3	3.0	ivx14bid	6/0	21.5	21.88+-5.8***	160.88
Preparación de inyección de polvo Rg3	1.5	ivx14bid	6/0	22.7	21.72+-3.1***	159.71
Preparación de inyección de polvo Rg3	0.75	ivx14bid	6/0	22.4	20.30+-4.7***	149.26
Preparación de inyección de polvo Rg3	0.375	ivx14bid	6/0	21.9	17.95+-3.5***	131.98
CTX	30	ipx7qd	6/1	22.2	29.20+-4.8***	214.71
Control negativo	Auxiliar relativo	ivx14bid	12/12	21.1	13.60+-2.39	-

Tabla 4 El bioensayo de eficacia de polvo liofilizado de ginsenosido Rg3 para inyección en el modelo MGC de cáncer gástrico humano (inoculación *in situ*, N=3)

Muestra	Dosis Mg/Kg/d	Protocolo de dosis	Animal Número (iniciación/final)	Peso corporal de animales (g) iniciación	Media de supervivencia (d) Media +- SD	Indice de extensión de vida T/Cx%
Preparación de inyección de polvo Rg3	3.0	ivx14bid	6/0	21.2	36.88+-3.0**	162.04
Preparación de inyección de polvo Rg3	1.5	ivx14bid	6/0	21.1	35.71+-3.1***	156.90
Preparación de inyección de polvo Rg3	0.75	ivx14bid	6/0	20.5	33.15+-3.6***	145.65
Preparación de inyección de polvo Rg3	0.375	ivx14bid	6/0	20.4	29.32+-4.7***	128.82
CTX	30	ipx7qd	6/2	21.8	41.20+-3.8***	181.02
Control negativo	Auxiliar relativo	ivx14bid	12/0	20.7	22.76+-2.14	-

Tabla 5. El bioensayo de eficacia de polvo liofilizado de ginsenosido Rg3 para inyección combinada con CTX en el modelo B16 de melanoma de ratón (N=3)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Muestra	Dosis Mg/Kg/d	Protocolo de dosis	Animal Número (iniciación/final)	Peso corporal de animales (g) iniciación	Colonia de pulmón Media +- SD	Indice antimetastásico%
Preparación de inyección de polvo Rg3	3.0	ivx14bid	10/10	20.3/25.3	19.1+-7.9***	62.03
Preparación de inyección de polvo Rg3	1.5	ivx14bid	10/10	20.5/25.2	22.4+-6.9***	55.47
Preparación de inyección de polvo Rg3	0.75	ivx14bid	10/10	19.5/24.7	27.3+-8.7***	45.73
Preparación de inyección de polvo Rg3	0.375	ivx14bid	10/10	20.4/25.2	30.2+-7.3***	39.96
Rg3+CTX	3.0+15	ivx14bid +ipX7qd	10/10	19.8/23.8	14.1+-3.6***	71.97
Rg3+CTX	1.5+15	ivx14bid +ipX7qd	10/10	19.1/24.5	16.3+-6.1**	67.59
Rg3+CTX	0.75+15	ivx14bid +ipX7qd	10/10	19.9/24.1	19.2+-4.7***	61.83
Rg3+CTX	0.375+15	ivx14bid +ipX7qd	10/10	19.6/24.2	21.9+-7.6***	56.46
CTX	15	ipx7qd	10/10	20.2/24.7	26.1+-5.2***	48.11
CTX	30	ipx7qd	10/10	19.9/22.6	3.30+-2.6***	93.44
Control negativo	Auxiliar relativo	ivx14bid	20/20	20.1/25.5	50.3+-13.1	-

Tabla 6. La potenciación de la eficacia de quimioterapia y bioensayo de eficacia de atenuación de la toxicidad de polvo liofilizado de ginsenosido Rg3 para inyección (N=20)

Grupo	Dosis Mg/Kg/d	Media peso tumor (g, media+-SD)	Indice de inhibición de tumor (%)	WBC ($10^9/L$)	Hb (g/L)	RBC $10^{12}/L$
H ₂ O Control	1.5X8	1.84+-0.85		6.3+-0.8	93+-2.5	3.2+-0.1
Rg3	1.5X3	0.69+-0.14**	62.50	8.1+-0.2**	109+-6.0**	3.7+-0.4**
CTX	10X3	0.89+-0.29**	56.52	3.2+-0.5**	82+-8.4**	2.8+-0.3**
5Fu	25X3	1.08+-0.34**	41.30	3.9+-0.3**	90+-13.0	3.1+-0.4
MTX	5X3	0.27+-0.01**	85.32	1.6+-0.1**	51+-1.0**	1.8+-0.1**
PDD	1X3	1.09+-0.30**	40.76	6.0+-0.2	90+-6.0	3.1+-0.2
inyección de polvo Rg3+CTX	1.5X8+10X3	0.48+-0.12**	73.91	7.1+-0.3**	85+-3.6	2.8+-0.8
inyección de polvo Rg3+5fu	1.5X3+25X3	0.95+-0.17**	48.37	7.8+-0.3**	87+-14.0	2.8+-0.8
inyección de polvo Rg3+MTX	1.5X8+5X3	0.20+-0.04**	89.13	5.2+-0.8*	91+-10.0	3.1+-1.0
inyección de polvo Rg3+PDD	1.5X8+1X3	1.03+-0.28**	44.02	6.6+-0.8*	103+-18.0*	3.6+-0.5*
El tumor implantado en animales es el modelo de cáncer de hígado de ratón Comparado con el grupo de control *p<0.05; ** p<0.01; Otros, p>0.05.						

Tabla 7. Efectos del polvo liofilizado de ginsenosido Rg3 para inyección sobre las actividades de NK de ratones portadores de cáncer (N=3)

Grupo	Dosis Mg/Kg	Protocolo de dosis	OD Valor medio+-SD	Actividad NK (%)
Preparación de inyección de polvo Rg3	3.00	pox10qod	0.387	42.29**
	0.60	pox10qod	0.351	46.41**
	0.12	pox10qod	0.351	43.82**
Ginsenosido total	100	pox10qod	0.368	41.83**
Control	Auxiliar relativo	pox10qd	0.525	19.84
			0.655	
**p<0.01, # OD valor medio del control de las células objetivo .				

Tabla 8. Efectos del polvo liofilizado de ginsenósido Rg3 para inyección sobre las actividades de IL-2 de ratones portadores de cáncer (N=3)

Grupo	Dosis Mg/Kg	Protocolo de dosis	Animal Número	IL-2 actividad media/cpm mean+-SD
Preparación de inyección de polvo Rg3	3.00	pox10qod	6	2836+-326**
	0.60	pox10qod	6	3122+-735**
	0.12	pox10qod	6	2414+-539**
Ginsenósido total	100.00	pox10qod	6	2785+-255**
Control	Auxiliar relativo	pox10qod	10	1351+-127
**p<0.01				

Tabla 9. Efectos del polvo liofilizado de ginsenósido Rg3 para inyección sobre la fagocitosis de macrófagos de la cavidad abdominal de ratones Kunming normales

Grupo	Dosis Mg/Kg	Protocolo de dosis	Fagocytosis media +-SD	
			Porcentaje Fagocitosis	Índice Fagocitosis
Preparación de inyección de polvo Rg3	3.00	pox10qd	31.80+-10.00**	0.55+-0.11**
	0.60	pox10qd	32.80+-10.30**	0.58+-0.14**
	0.12	pox10qd	28.70+-7.40**	0.55+-0.11**
Ginsenósido total	100.00	pox10qd	29.60+-10.00**	0.55+-0.11**
Control	Auxiliar relativo	pox10qd	20.90+-5.80	0.340-0.10
**p<0.01				

Ejemplo de operación 48**El bioensayo de eficacia antifatiga de las cápsulas de composición de 20(R)-ginsenosido Rg3****5 1 Bioensayo de eficacia antifatiga de las cápsulas de composición de 20(R)-ginsenosido Rg3 en ratones****1.1 Materiales y procedimientos**

10 **1.1.1 Muestras:** Cápsulas de la composición de 20(R)-ginsenosido Rg3 en las que el contenido es polvo blanco, suministradas por Dalian Fusheng Natural Medicine Development Corporation, Ltd. Diluirlas con agua destilada a las concentraciones esperadas.

1.1.2 Animales experimentales: 240 ratones Kunming macho de grado 1 suministrados por el Centro del Laboratorio de Animales de la Universidad de Sichuan, en nº de certificado es nº 67 de la Administración de Calidad de Animales de Laboratorio de Sichuan.

15 **1.1.3 Selección de la dosificación:** Basándose en la dosificación humana propuesta de 10 mg/60kg/d, el grupo de dosificación baja, media y alta se selecciona para ser 10, 20 y 30 veces la dosificación humana propuesta, es decir, relacionado con el animal, 1,67, 3,34 y 5,01 mg/kg/d.

1.1.4 Procedimientos experimentales: Los animales se asignaron aleatoriamente a un control negativo y 3 grupos de tratamiento, basándose en sus pesos corporales. El artículo de prueba se administra (2 %) por una sonda nasogástrica, una vez al día. Los controles negativos se administran con agua destilada. La administración continúa durante 30 días. Después de la última dosificación se miden individualmente diferentes indicadores.

20 **1.1.4.1 Prueba de nado con carga:** 30 minutos después de la última sonda nasogástrica, los ratones se cargan con 5 % de peso corporal de bloque de plomo y se ponen en una vitrina de nado (profundidad 30 cm, temperatura del agua $25 \pm 0,5$ °C) y se dejan nadar libremente. Registrar el tiempo de retención desde el inicio del nado hasta la muerte del animal, es decir, el tiempo de nado de los ratones.

25 **1.1.4.2 Prueba de escalada en poste:** 30 minutos después de la última sonda nasogástrica, los ratones se colocan en un receptáculo de Plexiglas de la base del poste y se mantienen en un estado tónico muscular estático. Registrar el tiempo de retención desde el inicio de la escalada hasta la caída al receptáculo debido a la fatiga muscular. Repetir el procedimiento durante 3 veces, y el tiempo de retención total en 3 mediciones es el tiempo de escala del poste (en segundos) de los ratones.

30 **1.1.4.3 Nitrógeno ureico en sangre y determinaciones de glucógeno en el hígado:** 30 minutos después de la última sonda nasogástrica, poner los ratones en una vitrina de nado (profundidad 30 cm, temperatura del agua $30 \pm 0,5$ °C) para dejarlos nadar durante 90 minutos. Después de eso se recogen muestras de sangre del plexo venoso ocular y se determina el contenido de nitrógeno ureico en suero (procedimiento de diacetiloxima), se extrae el hígado y se determina el glucógeno en el hígado (procedimiento de antrona).

35 **1.1.4.4 Determinaciones de ácido láctico:** 30 minutos después de la última sonda nasogástrica, las muestras de sangre se recogen del plexo venoso ocular de ratones y se determina el contenido de ácido láctico en sangre (por el procedimiento de biosensor de SBA). Después de eso, los ratones se ponen en una vitrina de nado (profundidad 30 cm, temperatura del agua $30 \pm 0,5$ °C) para que naden durante 10 minutos; se carga un bloque de plomo sobre la base de la cola de los ratones. Y las muestras de sangre se recogen del plexo venoso ocular de ratones inmediatamente después de empezar el nado, y 30 minutos después de nadar y se determina el contenido de ácido láctico en sangre.

40 **1.1.4.5 Análisis estadístico:** Los datos del estudio se analizan por análisis de variación, prueba de la q o prueba del orden, con un software estadístico SPSS 9.0.

1.2 Resultados**1.2.1 Efectos de las cápsulas de composición de 20(R)-ginsenosido Rg3 sobre el peso corporal de los ratones**

50 De la Tabla 1 podría demostrarse que no hay diferencias significativas en el peso corporal de ratones entre los grupos de tratamiento y los controles, ambos en el periodo central y final del experimento ($P>0,05$).

Tabla 1 Pesos corporales de los ratones (media \pm DE)

Grupo	Animal Número	Peso corporal de iniciación (g)	Peso corporal de término medio (g)	Peso corporal final (g)
Control negativo	57	20.58 \pm 1.51	30.04 \pm 3.44	34.04 \pm 4.21
Bajo	59	20.61 \pm 1.43	28.34 \pm 2.95	33.08 \pm 3.88
Medio	58	20.71 \pm 1.41	29.90 \pm 3.12	32.83 \pm 3.65
Alto	58	20.62 \pm 1.48	28.36 \pm 2.77	32.34 \pm 3.29

1.2.2 Efectos de las cápsulas de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 sobre el tiempo de nado con carga de los ratones

De la Tabla 2 podría demostrarse que el tiempo de nado con carga de los ratones del grupo de alta y baja dosis es significativamente elevado ($P < 0,05$) en comparación con controles; y no hay diferencia significativa entre el grupo de dosis media y el control negativo ($P > 0,05$).

Tabla 2 Tiempo de nado con carga de los ratones (media \pm DE)

Grupo	Animal Número	Tiempo de nado (segundos)	Valor P*
Control negativo	14	387+-239	
Bajo	14	703+-597	<0.05
Medio	14	519+-167	>0.05
Alto	14	707+-430	<0.05
*Comparado con el control negativo			

1.2.3 Efectos de las cápsulas de composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 sobre el tiempo de escalada del poste de los ratones

De la Tabla 3 podría demostrarse que el tiempo de escalada del poste de los ratones del grupo de media y baja dosis es significativamente elevado ($P < 0,05$) en comparación con controles; y no hay diferencia significativa entre el grupo de dosis alta y el control negativo ($P > 0,05$).

Tabla 3 Tiempo de escalada del poste de los ratones (media \pm DE)

Grupo	Animal Número	Tiempo de nado (segundos)	Valor P*
Control negativo	13	172+-115	
Bajo	13	340+-153	>0.05
Medio	13	332+-337	<0.05
Alto	13	183+-84	<0.05
*Comparado con el control negativo			

1.2.4 Efectos de las cápsulas de composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 sobre el nivel de nitrógeno ureico en suero después de deporte de los ratones

De la Tabla 4 podría demostrarse que el nivel de nitrógeno ureico en suero después de deporte de los ratones del grupo de alta y media dosis es significativamente disminuido ($P < 0,05$) en comparación con controles; y no hay diferencias significativas entre el grupo de dosis baja y el control negativo ($P > 0,05$).

Tabla 4 Nivel de nitrógeno ureico en suero después de deporte de los ratones (media \pm DE)

Grupo	Animal Número	Nivel de serum y nitrógeno en la urea (mg/dl)	Valor P*
Control negativo	12	27.95+-3.32	
Bajo	12	26.66+-4.24	<0.05
Medio	12	24.89+-3.70	>0.05
Alto	12	22.92+-2.25	>0.05
*Comparado con el control negativo			

1.2.5 Efectos de las cápsulas de composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 sobre el nivel de glucógeno en el hígado después de deporte de los ratones

De la Tabla 5 podría demostrarse que el nivel de glucógeno en el hígado después de deporte de los ratones del grupo de alta dosis es significativamente elevado ($P < 0,05$) en comparación con controles; y no hay diferencias significativas entre el grupo de baja y media dosis y el control negativo ($P > 0,05$).

Tabla 5 El nivel de glucógeno en el hígado después de deporte de los ratones (media \pm DE)

Grupo	Animal Número	Nivel de glicógeno hepático (mg/dl)	Valor P*
Control negativo	15	1817.07 \pm 1076.76	
Bajo	14	2327.14 \pm 1075.33	>0.05
Medio	15	1942.53 \pm 761.87	>0.05
Alto	14	2611.78 \pm 1049.64	<0.05

*Comparado con el control negativo

1.2.6 Efectos de las cápsulas de composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 sobre el nivel de ácido láctico en sangre después de deporte

De la Tabla 6 y 7 podría demostrarse que tanto para la acumulación de ácido láctico en sangre durante el deporte como para la eliminación de ácido láctico en sangre después del deporte no hay diferencias significativas entre el grupo de baja, media y alta dosis y el control negativo ($P > 0,05$).

Tabla 6 Acumulación de ácido láctico en sangre durante el deporte de los ratones (media \pm DE)

Grupo	Animal Número	Nivel de ácido láctico en sangre (mmol/L)			Valor P*
		Pre-deporte (A)	Post-deporte 0 minutos (B)	Diferencia (B-A)	
Control negativo	10	2.70 \pm 1.50	5.25 \pm 1.22	2.56 \pm 1.90	
Bajo	13	3.23 \pm 1.20	5.68 \pm 1.42	2.45 \pm 1.57	>0.05
Medio	14	2.90 \pm 1.01	5.15 \pm 1.14	2.25 \pm 1.12	>0.05
Alto	13	2.91 \pm 0.82	5.60 \pm 1.43	2.69 \pm 1.49	>0.05

*Diferencia (B-A) comparado con el control negativo

Tabla 7 Eliminación de ácido láctico en sangre después del deporte de los ratones (media \pm DE)

Grupo	Animal Número	Nivel de ácido láctico en sangre (mmol/L)			Valor P*
		Post-deporte 0 minutos (B)	Post-deporte 30 minutos (C)	Diferencia (B-C)	
Control negativo	10	5.25 \pm 1.22	1.58 \pm 0.47	3.68 \pm 0.91	
Bajo	13	5.68 \pm 1.42	1.83 \pm 0.97	3.85 \pm 1.24	>0.05
Medio	14	5.15 \pm 1.14	1.92 \pm 0.43	3.23 \pm 1.14	>0.05
Alto	13	5.60 \pm 1.43	1.78 \pm 0.61	3.82 \pm 1.31	>0.05

*Diferencia (B-C) comparado con el control negativo

1.3 Resumen

Los resultados del estudio del bioensayo de eficacia antifatiga de las cápsulas de composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 en ratones demuestran que el tiempo de nado con carga de ratones del grupo de alta y baja dosis y el tiempo de escalada del poste de ratones del grupo de media y baja dosis son todos significativamente mayores que aquellos de controles negativos ($P < 0,05$); el nivel de glucógeno en el hígado después de deporte en ratones del grupo de alta dosis es significativamente superior al de controles negativos ($P < 0,05$); el nivel de nitrógeno ureico en suero después de deporte en ratones del grupo de alta y media dosis es significativamente inferior al de controles negativos ($P < 0,05$); y no hay diferencias significativas en acumulación o eliminación de ácido láctico en sangre durante y después del deporte en 3 grupos de tratamiento y control negativo ($P > 0,05$). Según criterios de evaluación relevante se sugiere que la composición del artículo de prueba de cápsulas de 20(R)-ginsenósido Rg3 tiene un efecto antifatiga.

Ejemplo de operación 49**El bioensayo de mejora de la memoria de las cápsulas de composición de 20(R)-ginsenósido Rg3****1. Materiales y procedimientos****1.1 Materiales**

Fármaco: Gránulos de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 (10 mg/bolsa) suministrados por Dr Fu li.

Escopolamina, comprada de Chinese Testing Institute for Phamaceuticals y Bio-pharmaceutical Products. Los gránulos de Yiheng (10 mg/bolsa) se producen por Shanxi Kaiyuan Phamaceuticals Co., Ltd. Cuando se usan los productos anteriormente mencionados, disolverlos con solución salina a las concentraciones esperadas.

- 5 Animales experimentales: Ratones Kunming macho, 18 a 22 gramos, suministrados por el Colegio de Farmacia de la Universidad de Jilin.

10 Instrumentos: aparato de soporte de salto de ratones, laberinto de agua fabricado por el propio Colegio de Farmacia de la Universidad de Jilin. Regulador de voltaje de contacto fabricado por la fábrica de reguladores de voltaje de Shanghai Zhenghua del Zhongchuan Group.

1.2 Procedimientos

1.2.1 Procedimiento de bajada

15 Poner los ratones en la sala del laboratorio para aclimatación durante 1 hora antes de que empiece el experimento. Después de empezar la sesión de prueba, los animales se ponen sobre la plataforma segura del soporte de salto y se aclimatan al entorno durante 3 minutos. Después de eso se conecta una corriente de 36 de voltaje a la rejilla de cobre debajo de la plataforma. Cuando los animales bajan de la plataforma y aterrizan sobre la rejilla de cobre, inmediatamente recibirán un choque y se compondrá de una respuesta errónea. Si salta de nuevo al área segura, es una respuesta correcta. Entrenar los animales durante cinco minutos, y después de 24 horas, la prueba empieza de nuevo. Durante la prueba formal, el aparato de soporte de salto está conectado a una corriente de 36 de voltaje, y los animales se ponen sobre la plataforma segura, las respuestas erróneas se registran durante 3 minutos.

25 Etapas experimentales: 72 ratones cualificados sanos, se pesan los pesos corporales y se asignan aleatoriamente a 6 grupos, 12 ratones para cada grupo. La dosificación para los gránulos de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 es 2,16, 6,48 y 12,96 mg/kg, respectivamente, y la dosificación para gránulos de Yiheng de control positivo es 121,65 mg/kg. Para control de blanco y control de modelo se dosifica 0,1 ml/10 g de solución salina. Todos estos compuestos de prueba se administran consecutivamente durante 7 días, una vez al día. 1 hora después del último control de modelo, los controles de blanco se inyectan intraperitonealmente con volumen igual de solución salina, los animales en el control de modelo, grupos de tratamiento de gránulos de la composición de Rg3, control positivo de gránulos de Yiheng se inyectan intraperitonealmente con 4 mg/kg de escopolamina, respectivamente. Después de 30 10 minutos empieza la sesión de entrenamiento de bajada, y se probarán de nuevo después de 24 horas.

35 1.2.2 Procedimiento de laberinto de agua

El aparato de laberinto de agua para ratones está compuesto por un área de inicio, un circuito en zigzag con muchos callejones sin salida y un área segura (placa de escalón). Los ratones se colocan en el área de inicio 1 hora después de la dosificación y se indujeron para que nadaran al área segura. Cada animal se entrena 10 veces cada día, con un intervalo de 25 segundos. Si los animales llegan al área segura en 30 segundos, se cuenta como una respuesta correcta. Los animales son entrenados continuamente durante 4 días. Registrar el número de respuestas correctas y se calculan el porcentaje de respuestas correctas y el tiempo de llegada medio.

45 Procedimientos experimentales: 72 ratones cualificados sanos, se pesan los pesos corporales y se asignan aleatoriamente en 6 grupos, 12 ratones para cada grupo. La dosificación para los gránulos de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 son 2,16, 6,48 y 12,96 mg/kg, respectivamente, y la dosificación para los gránulos o Yiheng de control es 121,65 mg/kg. Para el control de blanco y el control de modelo se dosifican 0,1 ml/10 g de solución salina. Todos estos compuestos de prueba se administran consecutivamente durante 10 días, una vez al día. 1 hora después de la dosificación de 7 días, y 1 hora después de la última dosificación del día, los controles de blanco se inyectan intraperitonealmente con volumen igual de solución salina, los animales en el control de modelo, grupos de tratamiento de gránulo de composición Rg3, control positivo de gránulos de Yiheng, se inyectan intraperitonealmente con 4 mg/kg de escopolamina, respectivamente. Después de 10 minutos, la sesión de entrenamiento en laberinto de agua empieza. Cada animal se entrena 10 veces cada día, con un intervalo de 25 segundos. Si el animal llega al área segura en 30 segundos, se cuenta como una respuesta correcta. Registrar el número de respuestas correctas y se calcula el porcentaje de respuestas correctas.

2 Resultados

60 2.1 El efecto de mejora de la disfunción de adquisición de memoria inducida por escopolamina (procedimiento de bajada)

Los resultados del estudio se muestran en la Tabla 1. En comparación con el control de blanco, la respuesta errónea para animales en el control de modelo es significativamente elevada, sugiriendo que 4 mg/kg de escopolamina han inducido disfunción de adquisición de memoria, y el modelo es satisfactorio. En comparación con el control de modelo, la respuesta errónea durante el periodo de prueba en animales tratados con gránulos de la composición de 20(R)-ginsenósido Rg3 es significativamente disminuida, y la amplitud de la disminución es mayor que en el control

positivo de gránulos de Yiheng. Los resultados demuestran que los gránulos de la composición de 20(R)-ginsenosido Rg3 podrían mejorar la disfunción de adquisición de memoria inducida por escopolamina, y el aprendizaje y función de memoria de ratones.

5 **Tabla1. El efecto de mejora de la disfunción de adquisición de memoria inducida por escopolamina (procedimiento de bajada, n=12, media \pm DE)**

Grupo	Dosis (mg/kg)	n	Respuesta equivocada
Control en blanco		12	0.37 \pm 0.22***
Modelo de control de escopolamina		12	3.8 \pm 2.35
Control granulado Yiheng	121.65	12	0.96 \pm 0.73***
Composición Rg3 granulado	2.16	12	0.88 \pm 0.69***
Composición Rg3 granulado	6.48	12	0.70 \pm 0.36***
Composición Rg3 granulado	12.96	12	0.44 \pm 0.23***

25 **2.2 El efecto de mejora de la disfunción de discriminación espacial inducida por escopolamina (procedimiento de laberinto de agua)**

Los resultados del estudio se muestran en la Tabla 2. En comparación con el control de blanco, la respuesta correcta para animales en el control de modelo es significativamente disminuida. A partir del día de entrenamiento 2, la respuesta correcta en animales tratados con gránulos de la composición de 20(R)-ginsenosido Rg3 es elevada dependientemente de la dosis, demostrando que los gránulos de la composición de 20(R)-ginsenosido Rg3 podrían mejorar significativamente la disfunción de discriminación espacial inducida por escopolamina en ratones.

35 **Tabla 2 El efecto de mejora de la disfunción de discriminación espacial inducida por escopolamina (procedimiento de laberinto de agua, n=12, media \pm DE)**

Grupo	Dosis (mg/kg)	n	Respuesta correcta		
			Día 2	Día 3	Día 4
Control en blanco		12	33.11 \pm 24.10	42.33 \pm 22.14	52.08 \pm 31.31
Modelo de control de escopolamina		12	8.75 \pm 7.21	13.45 \pm 8.74	26.58 \pm 6.52
Control granulado Yiheng	121.65	12	10.88 \pm 6.64	17.95 \pm 17.23	27.96 \pm 26.47
Composición Rg3 granulado	2.16	12	10.98 \pm 5.12	25.87 \pm 14.52	52.71 \pm 29.46
Composición Rg3 granulado	6.48	12	19.25 \pm 15.34	35.26 \pm 15.49	55.78 \pm 23.56
Composición Rg3 granulado	12.96	12	27.98 \pm 17.68	59.80 \pm 26.41	61.58 \pm 34.64

Ejemplo de operación 50

55 El bioensayo de detumescencia, alivio de dolor y cicatrización de la composición de 20(R)-ginsenosido Rg3

1 Materiales y procedimientos

1.1 Animales experimentales: 30 ratas, suministradas por el Colegio de Farmacia de la Universidad de Jilin. Peso corporal, 250-300 gramos, la mitad macho y la mitad hembra, asignadas aleatoriamente a 3 grupos.

1.2 Procedimientos

65 1.2.1 Modelo de herida en animal para evaluación biológica: la piel en la pata trasera de ratas se depila con 8 % de sulfato de bario y se abstiene la piel de ser lesionada. Después de 24 horas, las ratas se anestesian por inyección intraperitoneal de 30 mg/kg de pentobarbital sódico al 3 % y se fijan en pronación en una placa de

modelado. Después de eso, un mazo de golpear de 1 kilogramo en la placa de modelado se levanta 10 cm y repentinamente cae perpendicularmente para golpear el músculo rico del centro del fémur de la pata trasera de la rata, así se produce un modelo de lesión aguda de tejido blando. Treinta minutos después de la lesión se hace una incisión de 1,5 a 3,0 cm en la piel herida, con una profundidad hasta la capa muscular, y se toma un tejido muscular de aproximadamente 0,5 gramos. La herida se trata correspondientemente para los grupos de animales: para el grupo de tratamiento con Rg3, composición de 20(R)-ginsenosido Rg3 (1 g disuelto en 1 ml de solución salina) se pone de parche, para el control positivo, polvo blanco de Yunnan (1 g disuelto en 1 ml de solución salina) se pinta y para el control negativo se pinta solución salina, todas las aplicaciones son una vez al día.

1.2.2 Observaciones: Las ratas se alojan por separado y se alimentan según su grupo. Después de despertarse después de la herida durante 0,5 horas, la superficie de la herida en ambas patas trasera se toca ligeramente con una varilla de plástico desechable cada 10 minutos, y los comportamientos relativos al dolor tales como chuparse la herida, reflejo de retirada de la extremidad, temblor del músculo de la pata trasera en posturas erguidas se observan durante 2 horas, en total se toca 12 veces. El estado de cicatrización general se fotografía en el día 3 y 7 después de la herida, y se registra la infección de la herida. En el día 7 después de la herida, los animales se sacrifican y se pesan, para evaluar los cambios del peso corporal.

1.2.3 Análisis estadístico: Los datos de enumeración se analizan por la prueba de X^2 y los datos de medición se analizan por el análisis de la varianza con un software SPSS 8.0. El nivel significativo se fija $P < 0,05$.

2 Resultados

2.1 Comportamientos relativos al dolor durante el periodo de despertar de 2 horas en diferentes grupos

Después del análisis de la varianza, diferencias significativas en general ($p < 0,05$) en los comportamientos relativos al dolor tales como chuparse la herida, reflejo de retirada de la extremidad, temblor del músculo de la pata trasera en posturas erguidas se observan entre 3 grupos (Tabla 1). Después de la comparación por parejas, para chuparse la herida, el grupo de tratamiento de composición de 20(R)-ginsenosido Rg3 es significativamente diferente ($p < 0,05$) del control positivo de polvo blanco Yunnan y el control negativo de solución salina; para el reflejo de retirada de la extremidad y temblor del músculo de la pata trasera en posturas erguidas no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) entre 3 grupos. Estos resultados demuestran que la composición de ginsenosido Rg3 tiene efecto analgésico y su eficacia es mejor que la del polvo blanco de Yunnan.

2.2 Infección de la herida de tejido después de la lesión en ambas patas traseras de ratas

Después de la prueba de X^2 hay diferencia significativa en la infección de la herida entre 3 grupos ($p < 0,01$), sugiriendo que la composición de ginsenosido Rg3 tiene efectos antiinfecciosos, la tasa de infección de la herida en el grupo de tratamiento de la composición de Rg3 es significativamente inferior a en el control positivo de polvo blanco de Yunnan y el control negativo de solución salina.

2.3 El estado global para la cicatrización en diferentes grupos

Después de la observación directa de la herida en el día 3 después de la lesión, las heridas en ratas del grupo de la composición de ginsenosido Rg3 están secas, sin exudados y la piel alrededor de la herida está obviamente encogida. Pero las heridas en ratas de control positivo de polvo blanco de Yunnan tienen alguna secreción, y la piel alrededor de las heridas está ligeramente encogida. Y las heridas en ratas de control negativo de solución salina tienen secreciones voluminosas, superficie de la herida alargada y la piel alrededor de las heridas tiene alguna cicatriz supurativa. En el día 7 después de la lesión, las heridas en ratas del grupo de composición de ginsenosido Rg3 están secas, sin infección y están completamente llenas de tejido de granulación, y la epitelización de novo se observa obviamente. Para las heridas en ratas de control positivo de polvo blanco de Yunnan, el área superficial de la herida está encogida, se observan algunos exudados y una delgada capa de tejido de granulación, pero no se observa obviamente epitelización de novo. Para las heridas en ratas de control negativo de solución salina se observan exudados voluminosos, las áreas superficiales de la herida no están encogidas y se forman algunas superficies de úlcera. De la observación anterior podría llegarse a la conclusión de que la composición de ginsenosido Rg3 tiene algunos efectos sobre la detumescencia, bacteriostasis y cicatrización, con una mejor eficacia que el polvo blanco de Yunnan y controles de sodio normales.

Tabla 1. Comparación de los comportamientos relativos de dolor entre 3 grupos

Grupo	n	Lamerse las heridas	Reflejo de reitarda del miembro	Temblo muscular
Control de solución salina	10	1.30+-1.50	0.70+-1.11	5.30+-3.16
Polvo blanco Yunnan	10	9.00+-2.16	9.40+-2.59	10.70+-1.33
Composición Rg3 Ginsenosido	10	11.20+-0.92	11.40+-0.84	10.40+-1.43
*Comparando Rg3 a los otros dos productos p<0.01				

Tabla 2 Comparación de las tasas de infección entre 3 grupos

Grupo	Herida infectada	Herida no infectada	Total
Control de solución salina	1	19	20
Polvo blanco Yunnan	17	3	20
Composición Rg3 Ginsenosido	8	12	20
* p<0.01			

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un tipo de composición acuosa de disolución medicinal de 20(R)-ginsenósido Rg3, en el que el contenido del ginsenósido Rg3 en esta disolución es 0,5~10 mg/ml y en el que la disolución comprende adyuvante A seleccionado de desoxicolato sódico, ácido desoxicólico, dodecilsulfato de sodio o arginina.
2. La disolución según la reivindicación 1, en la que la relación de peso de 20(R)-ginsenósido Rg3 con respecto al adyuvante A es 1:1~300.
3. La disolución según la reivindicación 2, en la que la disolución se prepara mediante un procedimiento que comprende la etapa 1, etapa 2, etapa 3 y etapa 4,
- en la que la etapa 1 comprende disolver el 20(R)-ginsenósido Rg3 en una mezcla de disolventes orgánicos y preparar la disolución de ginsenósido al 0,1~5 %;
- en la que la etapa 2 comprende disolver el adyuvante A en agua y preparar la disolución acuosa de material adyuvante al 0,1~30 %;
- en la que la etapa 3 comprende añadir la disolución de ginsenósido obtenida en la etapa 1 en su totalidad en la disolución acuosa de material adyuvante obtenida en la etapa 2 a 40~100 °C con la relación de 20(R)-ginsenósido Rg3 con respecto al adyuvante A = 1:1~300 y agitar la mezcla durante 0,1~3 horas para obtener una disolución transparente; y en la que la etapa 4 comprende recircular el disolvente de la disolución transparente obtenida en la etapa 3 a temperatura de 80~100 °C y con un grado de vacío de 0,01~0,08 MPa hasta que la disolución alcance un estado de casi sequedad de aproximadamente 2/3 del volumen original, reconstituir la disolución del estado de casi sequedad con agua al volumen original, recircular el disolvente descomprimiendo la disolución en casi sequedad; repetir el procedimiento anterior dos veces y reconstituir el material casi a sequedad con agua para inyección o agua purificada, y luego mezclar bien para disolver.
4. Un tipo de procedimiento de preparación de disolución acuosa de composición medicinal de 20(R)-ginsenósido Rg3 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende etapa 1, etapa 2, etapa 3 y etapa 4,
- en el que la etapa 1 comprende disolver el 20(R)-ginsenósido Rg3 en una mezcla de disolventes orgánicos y preparar la disolución de ginsenósido al 0,1~5 %;
- en el que la etapa 2 comprende disolver el adyuvante A en agua y preparar la disolución acuosa de material adyuvante al 0,1~30 %;
- en el que la etapa 3 comprende añadir la disolución de ginsenósido obtenida en la etapa 1 en su totalidad en la disolución acuosa de material adyuvante obtenida en la etapa 2 a 40~100 °C con la relación de 20(R)-ginsenósido Rg3 con respecto al adyuvante A = 1:1~300 y agitar la mezcla durante 0,1~3 horas para obtener una disolución transparente; y en el que la etapa 4 comprende recircular el disolvente de la disolución transparente obtenida en la etapa 3 a temperatura de 80~100 °C y con un grado de vacío de 0,01~0,08 MPa hasta que la disolución alcance un estado de casi sequedad de aproximadamente 2/3 del volumen original, reconstituir la disolución del estado de casi sequedad con agua al volumen original, recircular el disolvente descomprimiendo la disolución en casi sequedad; repetir el procedimiento anterior dos veces y reconstituir el material casi a sequedad con agua para inyección o agua purificada, y luego mezclar bien para disolver.
5. Un tipo de procedimiento de preparación de polvo para inyección liofilizado de composición medicinal de 20(R)-ginsenósido Rg3 que comprende
- mezclar uniformemente la disolución según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 con 0,1 % en peso de carbón activo de grado para inyección o añadir la disolución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 mediante un superfiltro,
- dejarla durante 30 minutos a 80 °C,
- eliminar el pirógeno filtrando con una membrana de filtro de microporos de 0,45 µm, dispensar con una membrana de filtro de microporos de 0,22 µm bajo condición estéril y liofilizar para formar el polvo para inyección liofilizado.
6. Un tipo de procedimiento de preparación de polvo para inyección liofilizado de la composición medicinal de 20(R)-ginsenósido Rg3 que comprende
- secar la disolución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 para obtener polvo soluble de ginsenósido Rg3 en agua,
- reconstituirla con agua para inyección para redisolver,
- mezclar uniformemente esta disolución con 0,1 % en peso de carbón activo de grado para inyección o añadir esta disolución por un superfiltro,
- dejarla durante 30 minutos a 80 °C,
- eliminar el pirógeno filtrando con una membrana de filtro de microporos de 0,45 µm, dispensar con una membrana de filtro de microporos de 0,22 µm bajo condición estéril y liofilizar para formar el polvo para inyección liofilizado.
7. Un uso de la disolución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 en la preparación de medicinas para

acción antitumoral, potenciamiento de las funciones inmunitarias humanas, mejora de la memoria humana, resistencia a la fatiga, detumescencia, alivio de dolor y cicatrización.

5 8. La disolución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 usada para acción antitumoral, potenciamiento de las funciones inmunitarias humanas, mejora de la memoria humana, resistencia a la fatiga, detumescencia, alivio de dolor y cicatrización.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

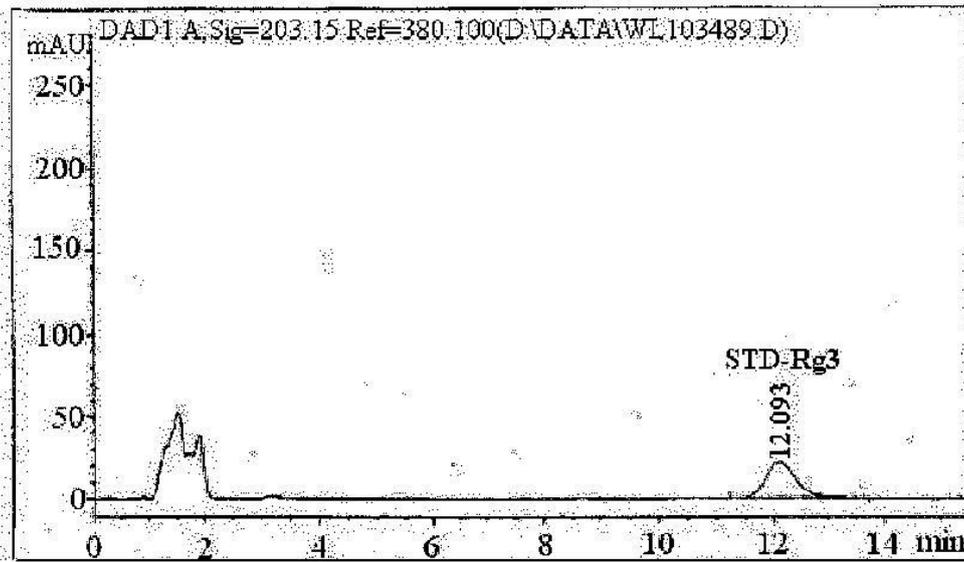


Figura 1

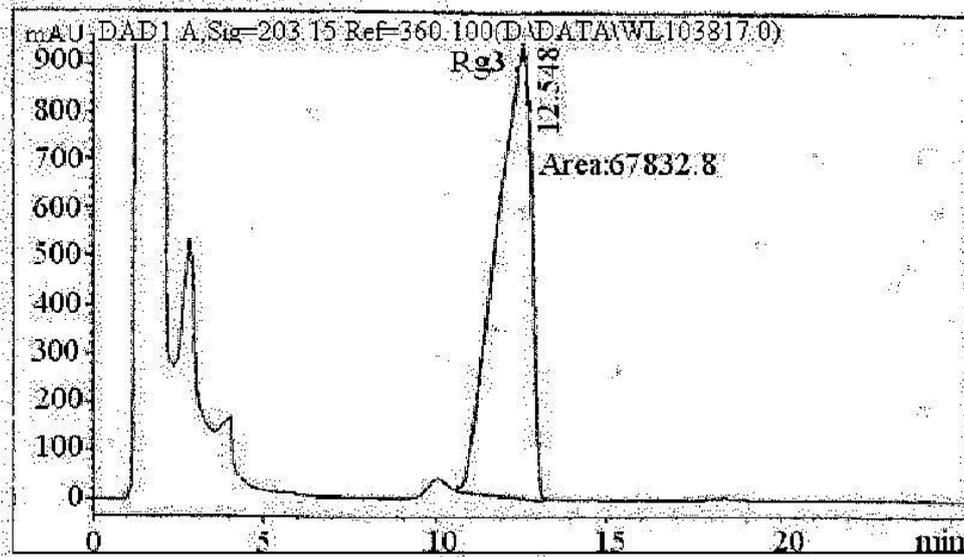


Figura 2

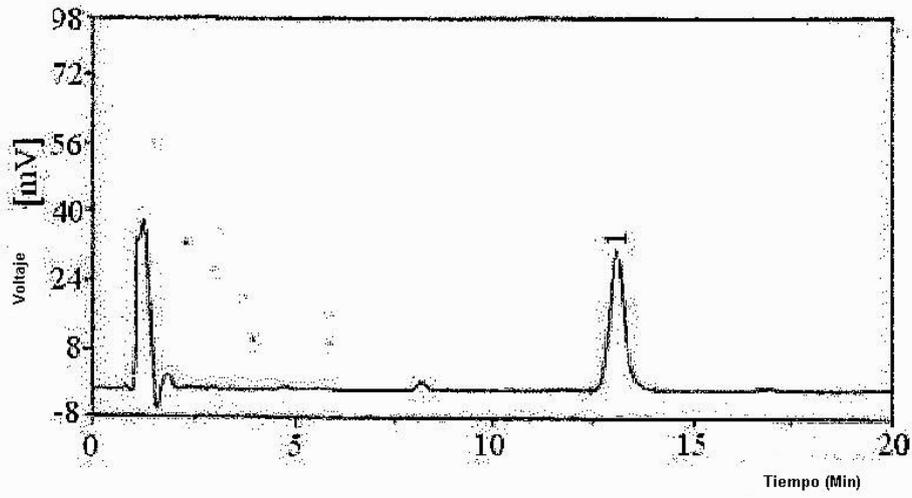


Figura 3

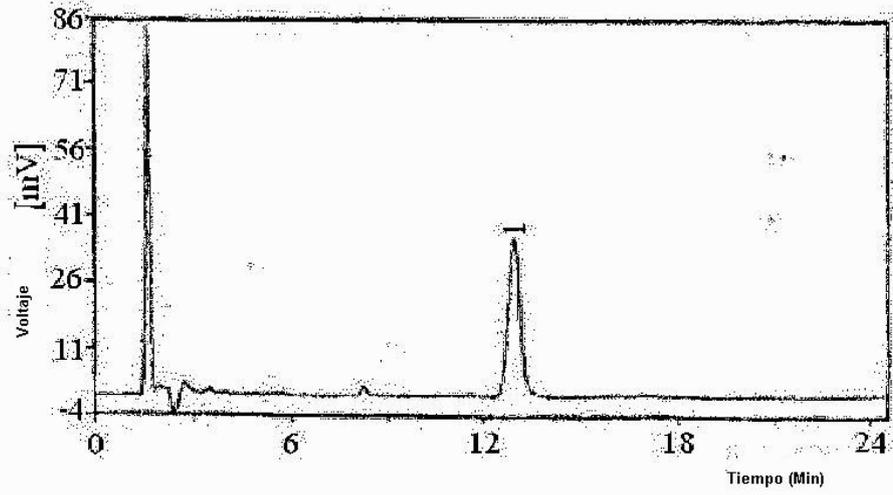


Figura 4

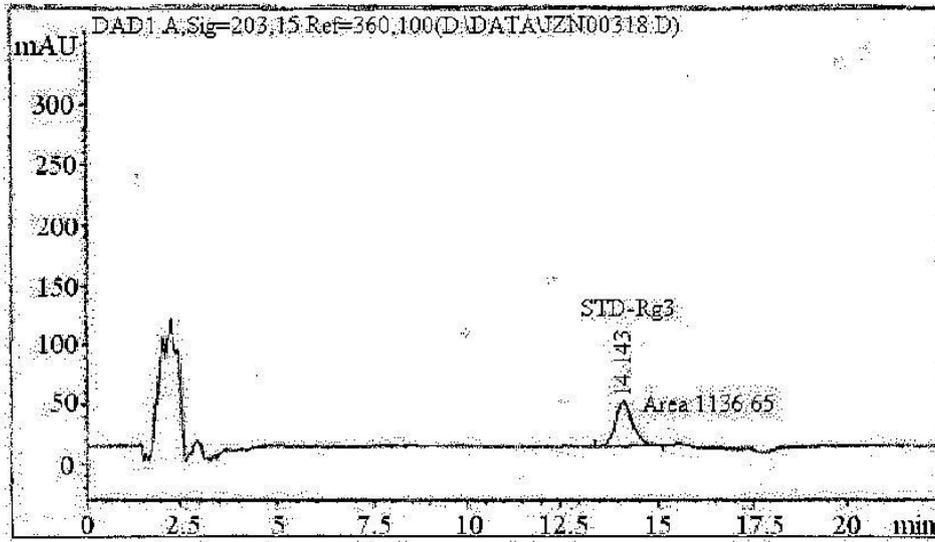


Figura 5

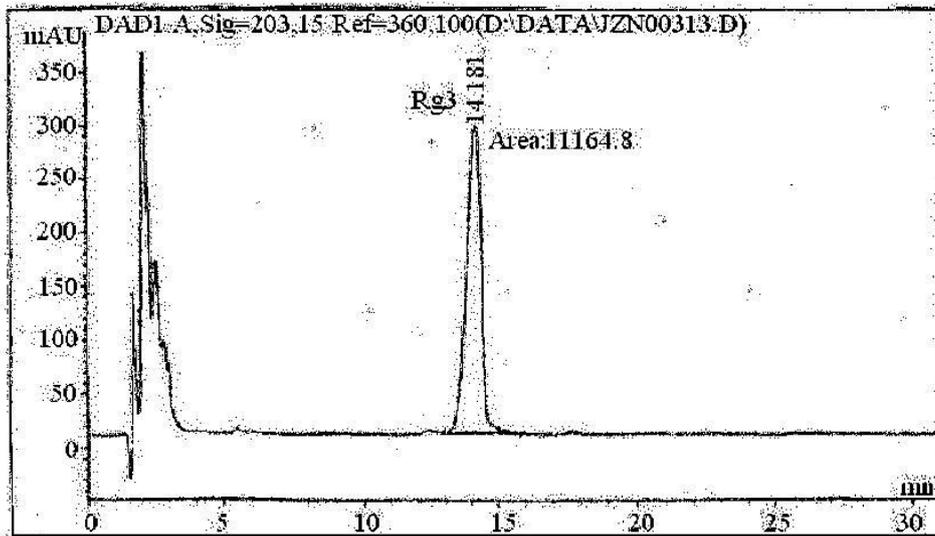


Figura 6

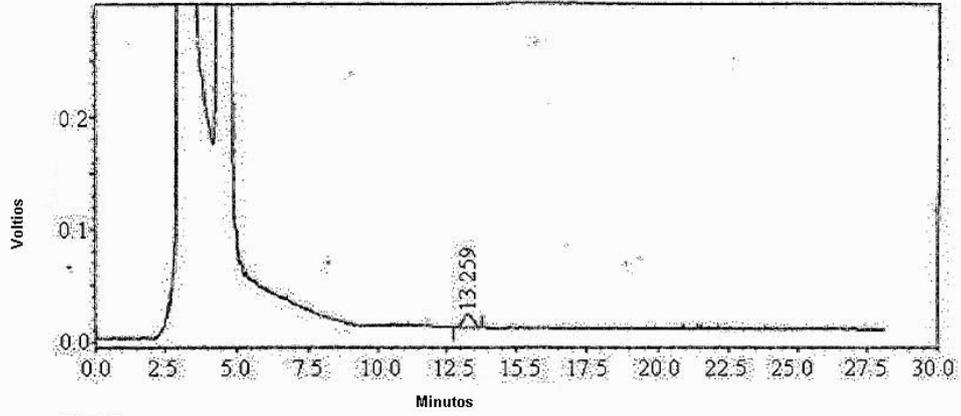


Figura 7

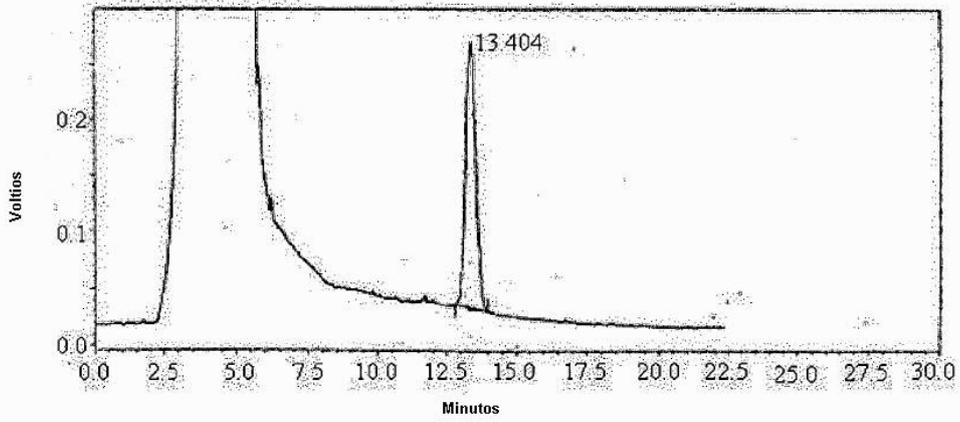


Figura 8

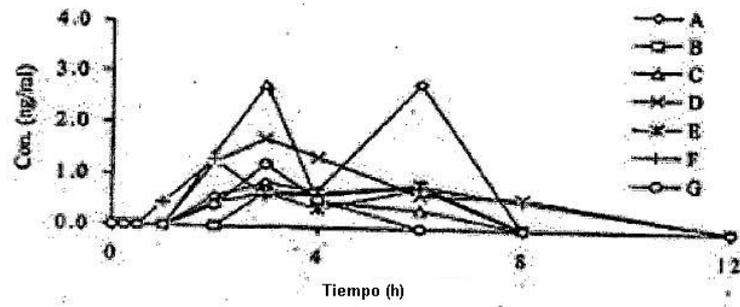


Figura 9

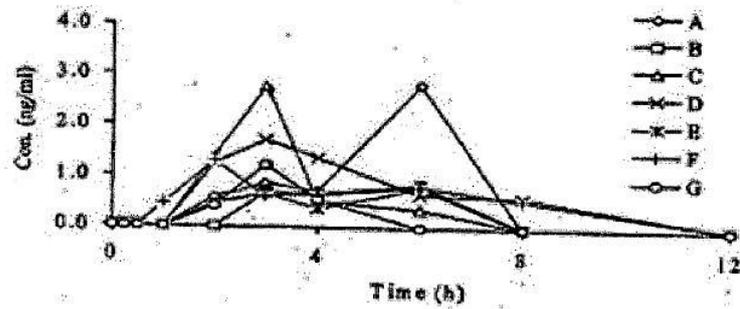


Figura 10

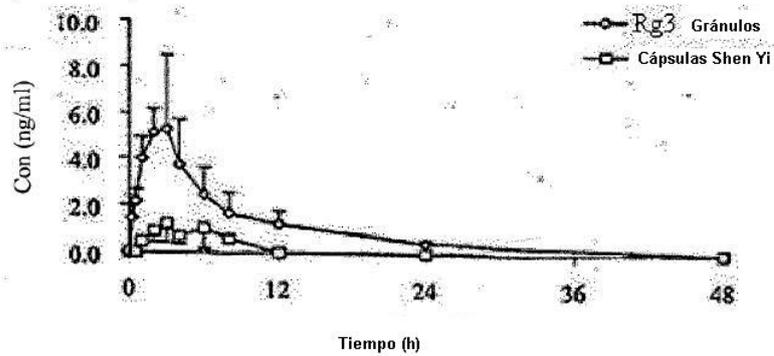


figura 11