

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 496 165**

51 Int. Cl.:

A61K 31/704 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

A61P 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.12.2007 E 07846012 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2133082**

54 Título: **El uso del ginsenósido Rg1 y sus metabolitos los ginsenósidos Rh1 y/o PpT**

30 Prioridad:

12.03.2007 CN 200710064326

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

18.09.2014

73 Titular/es:

**JECUI HEALTH INDUSTRY CORP. LTD. (50.0%)
No. 161 YongAn Road, Chuxiong
Yunnan 675000, CN y
INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE
ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ZHANG, JUNTIAN y
CHU, SHIFENG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 496 165 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

El uso del ginsenósido Rg1 y sus metabolitos los ginsenósidos Rh1 y/o PpT

5 **Área técnica**

La presente invención se refiere a la utilización de un principio activo elegido entre el ginsenósido Rg1 y sus metabolitos los ginsenósidos Rh1 y Ppt para preparar un medicamento y un producto para el cuidado de la salud destinado a mejorar la función sexual de los machos mamíferos, para preparar un medicamento que tenga el efecto de espermatogénesis, en particular para preparar un medicamento y un producto para el cuidado de la salud destinado a promover la espermatogénesis y aumentar la cantidad y/o la calidad de los espermatozoides.

La presente invención se relaciona además con una composición farmacéutica y un producto para el cuidado de la salud destinado a mejorar la función sexual de los machos mamíferos, y/o para proporcionar el efecto de espermatogénesis, en particular para promover la espermatogénesis y aumentar la cantidad y/o la calidad de los espermatozoides, que comprende al menos un principio activo elegido entre el ginsenósido Rg1 y sus metabolitos ginsenósido Rh1 y Ppt, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 **Antecedentes técnicos**

Según las estadísticas, entre las parejas en edad fértil en todo el mundo, la tasa de esterilidad es de aproximadamente 15%, y aproximadamente 40% de los factores que causan la esterilidad se atribuyen al integrante masculino. Desde el siglo XX, la fertilidad del hombre obviamente tiende a disminuir en todo el mundo debido a la contaminación ambiental, la propagación de enfermedades sociales y el SIDA, el exceso de consumo de tabaco y la drogadicción, el abuso de medicamentos hormonales, etc.

Por una parte, un estudio epidemiológico demuestra que, entre los hombres mayores de 20 años en Estados Unidos, la tasa de incidencia de la disfunción eréctil es de 18.4%. Si se calcula según la estadística del censo realizado en 2000, el número de hombres que sufren de esta enfermedad en Estados Unidos debe ser del orden de 18 millones. La tasa de incidencia de esta enfermedad está estrechamente relacionada con la edad, variando de 5.1% (hombres entre 20 y 39 años) a 70.2% (hombres de más de 70 años de edad).

En su conjunto, 65.0% de los hombres siempre puede tener una erección normal y completar el coito; 16.5% de los hombres puede tener una erección normal en casos generales; 12.3% de los hombres de vez en cuando puede tener una erección y completar el coito; y 6.2% de los hombres no tiene nunca una erección normal. Como inhibidor de la PDE5 para administración oral, el Sildenafil alivia el dolor a millones de pacientes que sufren de disfunción sexual, pero algunos efectos secundarios que resultaron posteriormente también son muy serios.

Por otra parte, según se informó, desde 1940 a 1990, la cantidad de espermatozoides contenidos por ml de semen de los adultos ha disminuido de 1.13×10^8 a 6.6×10^7 , y la cantidad de semen ha disminuido de 3.40 ml a ml 2.75. En comparación con la situación en 1940, la densidad espermática de los hombres en todo que el mundo ha disminuido en un 50%, es decir, ha disminuido en un 1% anual en promedio. Además de la disminución en la cantidad de espermatozoides, la proporción de espermatozoides activos y la proporción de espermatozoides de forma normal también disminuye año tras año (cuyos valores han disminuido 0.6% y 0.5% por año, respectivamente).

La disminución continua de la calidad del semen conduce directamente a una menor fertilidad y función reproductora, lo que gradualmente se ha convertido en un problema social evidente. Uno de los factores cruciales que causan esterilidad masculina es la disminución en la calidad de los espermatozoides (cantidad y movilidad de los espermatozoides), así que es muy importante buscar un medicamento que pueda mejorar la calidad de los mismos. Sin embargo, hasta ahora, no hay ningún medicamento en todo el mundo que tenga un efecto terapéutico exacto y pueda aumentar la cantidad de espermatozoides y mejorar la actividad de los mismos.

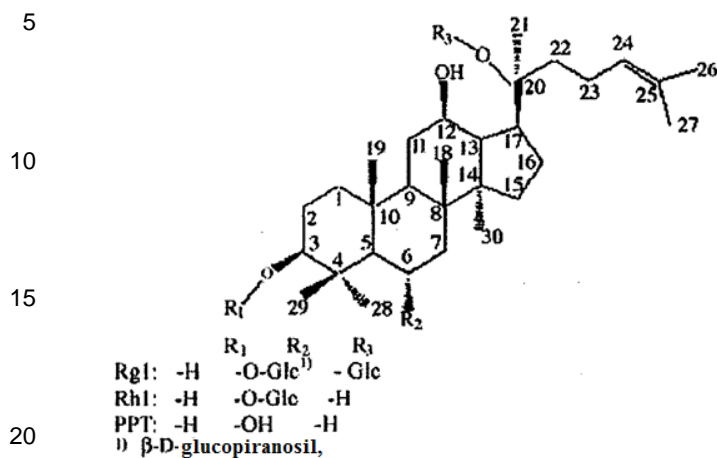
Por lo tanto, en el campo de la medicina reproductiva, ha sido desde hace tiempo un problema difícil, aún por resolverse, el desarrollo de un medicamento capaz de mejorar la función sexual de los machos mamíferos, en particular los hombres, aumentar la cantidad de espermatozoides y mejorar la calidad de los mismos.

Para solucionar el problema anterior, los inventores de la presente descubrieron luego de varias investigaciones que el derivado vegetal el ginsenósido Rg1, en particular sus metabolitos los ginsenósidos Rh1 y/o Ppt, pueden efectivamente mejorar la función sexual de los hombres, promover la espermatogénesis, aumentar la cantidad de espermatozoides y mejorar la calidad de los mismos.

Resumen de la invención

Como es bien sabido, el ginsenósido es uno de los principales ingredientes del ginseng. En la actualidad, se han aislado y extraído al menos 40 tipos de monómeros de ginsenósido de la planta de ginseng, que se pueden dividir

generalmente en las tres categorías siguientes en términos de sus estructuras químicas: 20s-protopanaxadiol, 20s-protopanaxatriol y ácido oleanólico. El ginsenosido Rg1 pertenece a la categoría de 20-protopanaxatriol y se convierte en Rh1 y/o Ppt después del metabolismo, los cuales se expresan en la estructura siguiente:



En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un principio activo elegido entre el ginsenosido Rg1, en particular sus metabolitos los ginsenosidos Rh1 y/o Ppt, para mejorar la función sexual de los machos mamíferos.

25 La presente invención se refiere a la utilización de un principio activo elegido entre el ginsenosido Rg1 y sus metabolitos los ginsenosidos Rh1 y Ppt para la preparación de un medicamento que tenga el efecto de espermatogénesis. En la presente invención, el término "espermatogénesis" incluye promover la espermatogénesis, aumentar la cantidad de espermatozoides y/o mejorar la calidad de los mismos.

30 En la presente invención, los mamíferos son preferentemente humanos.

Como es bien sabido, el gospol contenido en el aceite de semilla de algodón es un agente tóxico. Daña la espermatogénesis del tejido testicular, causando así una disminución de la cantidad de espermatozoides, una menor tasa de supervivencia de los espermatozoides y una menor actividad de los mismos. Los inventores de la presente establecieron un modelo de aspermatogénesis mediante el uso de ratones adultos con administración ip de acetato de gospol.

Los inventores de la presente descubrieron que, al mismo tiempo de la administración de gospol a los ratones, la administración del ginsenosido Rg1 por sonda nasogástrica en diferentes dosis podía aliviar notablemente el daño del gospol sobre la calidad de los espermatozoides y aumentar significativamente la cantidad de espermatozoides, aumentar la tasa de supervivencia de los espermatozoides y mejorar la movilidad de los mismos.

Los inventores de la presente estudiaron además el mecanismo del ginsenosido Rg1 para promover la espermatogénesis. La función del gospol que daña los espermatozoides incluye principalmente interferir en la metamorfosis de las espermátides y el desarrollo de los espermatozoides en las etapas media y tardía, produciendo así daño a los espermatozoides y atrofia de los túbulos seminíferos contorsionados.

Se descubrió mediante el estudio, que el efecto perjudicial del gospol sobre los espermatozoides se debió principalmente a que genera un exceso de óxido nítrico (NO) en el tejido testicular. El NO, como radical libre, daña el tejido espermatógeno y las espermátides así como las células intersticiales, y de esa manera reduce la generación y la liberación de testosterona (T).

Los inventores de la presente determinaron mediante radioinmunoensayo el contenido de óxido de nitrógeno (NO) en el tejido testicular y el contenido de testosterona (T), hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH) en el suero. Los resultados de la prueba demostraron que Rg1 pudo reducir notablemente el exceso de NO en el tejido testicular, para proteger así los espermatozoides del daño causado por NO y aumentar el contenido de T en la sangre. Mientras tanto, Rg1 no ejerció ninguna influencia notable sobre el contenido de LH y FSH en sangre (P > 0.05).

60 Después de estudios adicionales sobre los metabolitos del ginsenosido Rg1 los ginsenosidos Rh1 y Ppt, los inventores de la presente encontraron sorprendentemente que estos metabolitos por sí mismos también tuvieron independientemente el efecto de mejorar la espermatogénesis de los machos mamíferos.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" utilizada en este documento se refiere a una cantidad que puede producir el efecto terapéutico deseado, por ej., curar, prevenir, inhibir o inhibir al menos parcialmente o prevenir al

menos parcialmente la enfermedad o el trastorno, cuando se administra a un sujeto específico según la naturaleza y la gravedad de la enfermedad o el trastorno del sujeto.

La dosis terapéuticamente eficaz del compuesto en la presente invención se determina de acuerdo con los datos obtenidos a partir, por ej. de la prueba de incubación celular y del estudio en animales, y se puede usar en la preparación del rango de dosis útil para los humanos y otros mamíferos. La dosis del compuesto se encuentra preferentemente dentro del rango que tiene la toxicidad mínima o ninguna toxicidad e incluye DE_{50} en la concentración sistémica plasmática o de otros fluidos corporales. La dosis puede variar dentro de este rango, dependiendo de la forma farmacéutica utilizada y de la vía de administración.

Para cualquier compuesto de la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar al inicio de acuerdo con la prueba en animales. La dosis se puede diseñar en un modelo animal, de tal modo de obtener el rango de prueba que incluye CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza la mitad de la concentración inhibitoria máxima) en la concentración sistémica plasmática. Esta información se puede utilizar para determinar con mayor exactitud la dosis que se puede utilizar en humanos y otros mamíferos. El nivel plasmático del compuesto se puede determinar, por ej., por cromatografía líquida de alto rendimiento.

La cantidad del compuesto que puede constituir una forma farmacéutica de dosis única en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable varía según el sujeto en tratamiento y el modo de administración concreto. Como entenderá un experto, la cantidad unitaria de compuesto contenida en dosis individuales de cada forma farmacéutica no necesita constituir una cantidad terapéuticamente eficaz por sí misma, porque la cantidad terapéuticamente eficaz se puede lograr mediante la administración de varias dosis individuales. La elección de la dosis depende de la forma farmacéutica utilizada, la enfermedad que se va a tratar y el objetivo concreto que se pretende lograr determinado por una persona experta en el área.

Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para mejorar la espermatogénesis, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un principio activo elegido entre el ginsenósido Rg1, sus metabolitos los ginsenósidos Rh1 y Ppt, y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En la presente invención, la frase "mejorar la función sexual de los machos mamíferos" se refiere a aumentar la frecuencia del comportamiento sexual y acortar el período latente del comportamiento sexual de los machos. En concreto, el mecanismo de acción de mejora de la función sexual de los machos mamíferos reside en aumentar el contenido de testosterona en el suero de dichos machos mamíferos, y aumentar el contenido de cGMP en los cuerpos cavernosos.

Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para mejorar la espermatogénesis de los machos mamíferos, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un principio activo elegido entre el ginsenósido Rg1 y sus metabolitos los ginsenósidos Rh1 y Ppt. En la presente invención, la expresión "el efecto de espermatogénesis" incluye promover la espermatogénesis, aumentar el número de espermatozoides y/o mejorar la calidad de los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Efecto del ginsenósido Rg1 y sus metabolitos los ginsenósidos Rh1 y/o Ppt en la mejora de la función sexual de los ratones.

1.1.1 Materiales y método

1.1.1.1 Animales para la prueba

Se colocaron ratones machos Kunming (10 semanas de vida, peso corporal 32 a 36 g) y ratones hembras Kunming (10 semanas de medida, peso corporal de 30 a 34 g), comprados al Laboratory Animal Center of Chinese Academy of Medical Sciences (con el número de certificado SCXK (Jing) 2005-0004), en un animalario categorizado como limpio, alternativamente en luz y oscuridad (12 h : 12 h), mientras ingerían agua y alimentos a voluntad. La prueba comenzó después de que los ratones se adaptaron al ambiente del animalario durante 5 días. Durante el período de adaptación al ambiente, los ratones machos y hembras se aislaron unos de otros.

1.1.1.2 Preparación de ratones hembras en celo

Para reflejar correctamente el cambio de la función sexual en los ratones machos, preparamos ratones hembras en celo mediante extirpación de los ovarios e inducción del celo por aplicación externa de hormonas. Después de ser anestesiadas con hidrato de cloral, las hembras se sometieron a los pasos de extirpación bilateral de ovarios por abordaje dorsal, ligadura del extremo residual del tubo uterino y sutura de la piel, seguido de recuperación durante

una semana. La inducción mediante la aplicación de hormonas se llevó a cabo según la bibliografía (Masayoshi Nomura, et al, Physiology & Behavior 91 (2007) 223-228), que comprende los pasos de inyección subcutánea de benzoato de estradiol (30 µg por ratón, sc) 48 h antes del uso e inyección subcutánea de progesterona (500 µg por ratón, sc) 4 h antes del uso, de tal modo de obtener ratones hembras en celo.

1.1.1.3 Selección de ratones machos

Se pusieron ratones hembras en celo en una proporción de 2:1 respecto a los ratones machos dentro de una caja de apareamiento en la que se colocaron los ratones machos. Se entrenaron durante 5 días consecutivos, 12 minutos cada día. Cuando la reacción de apareamiento de los ratones machos se volvió estable, los ratones se agruparon con la consideración de que el tiempo de monta en cada grupo de ratones fuera sustancialmente el mismo, descartando los ratones que tenían una reacción relativamente débil y los que no tenían reacción.

1.1.1.4 Prueba de etología sexual

En la oscuridad, la prueba etológica se llevó a cabo en la jaula de cría de los ratones machos. Los ratones hembras en celo y los ratones machos se mantuvieron en una proporción de 2:1 dentro de la misma caja por 12 minutos, durante ese periodo se observaron el tiempo de monta y la frecuencia de apareamiento de los ratones machos.

1.1.2 Análisis estadístico

Todos los valores se expresaron utilizando el valor medio y el error estándar (M + EEM), el método analítico utilizado fue un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y los resultados estadísticos se expresaron por método de la doble estrella, es decir, * < 0.05, ** < 0.01.

1.1.3 Resultados

1.1.3.1 Influencia del ginsenosido Rg1 y sus metabolitos los ginsenosidos Rh1 y/o Ppt sobre el tiempo de monta de los ratones

Como se puede ver en la tabla 1, en el día 16 o 18 después de la administración, el ginsenosido Rg1 y sus metabolitos los ginsenosidos Rh1 y/o Ppt, en comparación con el grupo de control, todos pudieron prolongar notablemente el tiempo de monta de los ratones, sin diferencia estadística entre tres de Rg 1, Rh1 y Ppt. *P < 0.05 vs el grupo de control.

Tabla 1

Influencia del ginsenosido Rg1 y sus metabolitos los ginsenosidos Rh1 y/o Ppt sobre el tiempo de monta de los ratones (min) (n = 7 a 8)

Grupo Tiempo	Control	Rg1 (5 mg/kg)	Rg1 (10 mg/kg)	Rh1 (5 mg/kg)	Rh1 (10 mg/kg)	Ppt (5 mg/kg)	Ppt (10 mg/kg)
Día 1	2.9±3.2	3.1±4.3	3.3±2.3	2.8±3.2	3.6±2.7	3.3±2.3	2.9±3.4
Día 4	3.6±4.3	2.9±3.4	3.5±3.1	3.5±4.1	3.9±3.8	3.9±4.2	3.3±4.1
Día 8	4.2±3.6	3.9±3.1	4.2±3.6	4.1±3.5	4.0±3.5	4.5±3.8	5.1±3.8
Día 12	5.3±5.4	7.6±4.1	8.6±4.3	6.2±2.9	6.3±2.6	6.8±3.3	7.2±3.3
Día 14	5.2±5.6	6.9±3.5	7.9±3.7	8.6±5.2	8.4±3.1	7.9±4.4	8.4±4.2
Día 16	5.4±4.8	8.6±2.8	9.2±3.6	8.7±4.2*	8.9±3.7*	8.3±3.1*	9.4±3.9*
Día 18	5.3±5.5	9.4±3.7*	9.3±3.6*	8.9±3.3*	9.1±3.8*	9.2±3.8*	9.4±3.9*
Día 20	4.2±3.1	9.5±3.4*	9.8±3.8*	9.2±3.4*	9.3±3.8*	9.1±3.5*	9.4±3.1*

1.1.3.2 Influencia de ginsenosido Rg1 y sus metabolitos los ginsenosidos Rh1 y/o Ppt sobre la frecuencia de apareamiento de los ratones

5 Como se puede ver en la tabla 2, en el día 18 después de la administración, el ginsenosido Rg1 y sus metabolitos los ginsenosidos Rh1 y/o Ppt todos pudieron aumentar notablemente la frecuencia de apareamiento de los ratones, sin diferencia estadística entre tres de Rg1, Rh1 y Ppt. *P < 0.05 vs el grupo de control.

Tabla 2

Influencia del ginsenosido Rg1 y sus metabolitos los ginsenosidos Rh1 y/o Ppt sobre la frecuencia de apareamiento de los ratones (n = 7 a 8)

Grupo	Control	Rg1 (5 mg/kg)	Rg1 (10 mg/kg)	Rh1 (5 mg/kg)	Rh1 (10 mg/kg)	Ppt (5 mg/kg)	Ppt (10 mg/kg)
Día 1	12.4±7.3	15.4±6.4	13.8±3.4	11.3±4.9	9.7±5.6	11.4±6.8	13.4±6.3
Día 4	17.3±8.3	18.7±4.2	20.1±4.8	13.9±3.3	14.3±9.5	15.4±8.2	15.4±8.4
Día 8	22.4±6.8	25.6±5.2	28.3±5.6	23.5±5.7	25.7±8.6	27.4±8.7	22.8±9.6
Día 12	27.3±8.8	32.8±6.6	25.3±7.1	29.4±4.8	28.4±10.5	28.2±9.3	31.6±8.4
Día 14	25.2±9.3	29.3±7.0	33.3±6.6	33.6±6.1	32.2±9.3	29.5±7.7	33.7±8.5
Día 16	28.4±7.2	42.1±10.1	37.9±12.7	32.2±5.3	34.1±8.2	33.5±10.4	35.3±9.3
Día 18	26.2±9.3	43.7±8.7*	45.1±10.8*	39.8±9.3*	36.4±6.7*	39.2±8.6*	37.2±8.3*
Día 20	22.4±8.9	43.3±7.8*	44.2±9.4*	38.1±8.5*	43.4±7.3*	41.7±7.4*	40.2±7.3*

1.1.3.3 Influencia del ginsenosido Rg1 sobre el contenido de testosterona en el suero de los ratones

Luego de la administración oral del ginsenosido Rg1 durante 20 días, se analizó el contenido de testosterona en el suero de los ratones machos mediante radioinmunoensayo. Los resultados demostraron que el ginsenosido Rg1 (10 mg/kg) pudo aumentar notablemente el contenido de testosterona en el suero. N = 6 a 8. *P < 0.05 vs el grupo de control (los resultados se indican en la tabla 3).

Tabla 3

Influencia del ginsenosido Rg1 sobre el contenido de testosterona en el suero de los ratones	
Grupo y dosis (mg/kg)	Contenido de la testosterona (pmol.ml ⁻¹)
Control	4.20
Rg1 (2.5 mg/kg)	5.11
Rg1 (5,0 mg/kg)	5.18
Rg1 (10,0 mg/kg)	7.90*

Como se puede ver de los índices etológicos reflejados por los resultados anteriores, el ginsenosido Rg1 y sus metabolitos los ginsenosidos Rh1 y/o Ppt todos pudieron mejorar notablemente la etología sexual de los ratones y aumentar la sexualidad de los mismos. Se pudo encontrar también mediante el estudio, que tanto la administración a corto plazo como a largo plazo pudo aumentar el contenido de testosterona en el suero de los animales.

La testosterona desempeña un papel fundamental en términos de la erección del pene y el comportamiento sexual. La erección del pene depende de la acción conjunta de la estimulación de la señal excitatoria liberada por sistema nervioso central y la liberación de la reserva de neurotransmisor periférico. La realización de esta acción conjunta sólo es catalizada por la testosterona. Que el ginsenosido Rg1 y sus metabolitos los ginsenosidos Rh1 y/o Ppt puedan aumentar notablemente el contenido de testosterona en el suero de los ratones es uno de los mecanismos que mejora la función sexual de los ratones.

1.2.1 Influencia del ginsenosido Rg1 sobre la liberación de NO y el contenido de cGMP en los cuerpos cavernosos del conejo blanco Newland, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4

Influencia del ginsenósido Rg1 en diferentes concentraciones sobre la liberación de NO y el contenido de cGMP en los cuerpos cavernosos del conejo blanco Newland.			
Grupo y dosis (mg/kg)	NO ($\mu\text{mol/g}$ de proteína)	cGMP (pmol/g)	n
Control	21.67 \pm 4.69	73.08 \pm 31.43	7
Rg1 (2.5 mg/kg)	27.97 \pm 6.90	87.40 \pm 42.86	7
Rg1 (5,0 mg/kg)	28.43 \pm 6.04*	98.10 \pm 48.40	6
Rg1 (10,0 mg/kg)	30.35 \pm 6.70*	102.73 \pm 50.80*	6

5 Como se muestra en la tabla 4, el ginsenósido Rg1 pudo aumentar la liberación de NO en los cuerpos cavernosos del conejo de manera dependiente de la dosis. El grupo del ginsenósido Rg1 (5, 10 mg/kg) pudo aumentar significativamente la liberación de NO en comparación con el grupo de control, con una diferencia significativa entre los dos grupos. El ginsenósido Rg1 (10 mg/kg) pudo aumentar notablemente el contenido de cGMP en los cuerpos cavernosos en comparación con el grupo de control. *P < 0.05 vs el grupo de control.

10 El ginsenósido Rg1 no sólo pudo aumentar la liberación de NO, sino que también aumentó el contenido de cGMP en los cuerpos cavernosos, para así provocar la erección del pene. Para dilucidar aún más el mecanismo del ginsenósido Rg1 por el cual aumenta el contenido de cGMP, analizamos el contenido de cGMP bajo la acción conjunta de nitroprusiato de sodio (dador de NO) y ginsenósido Rg1, y observamos que, en el caso de la administración de nitroprusiato de sodio a la misma dosis, el grupo del ginsenósido Rg1 aún resultó con un mayor contenido de cGMP que el grupo de control. Se sugirió que el ginsenósido Rg1 podía prevenir la degradación de cGMP por PDE5. Para probar este punto, estudiamos el efecto de inhibición del ginsenósido Rg1 sobre PDE5.

1.2.2 Efecto de inhibición del ginsenósido Rg1 sobre PDE5

20 Tabla 5

Efecto de inhibición del ginsenósido Rg1 sobre PDE5		
Tratamiento	Inhibidor (nmol/l)	Tasa de inhibición (%)
Sildenafil	2.5	71.6
	5.0	14.6
	10.0	52.6
	20.0	83.3
	40.0	100
Ginsenósido Rg1	2.5	46.7
	5.0	40
	10.0	63.4
	40.0	100
	80.0	100
Sildenafil CI_{50} = 3.42 nmol		
Ginsenósido Rg1 CI_{50} = 4.34 nmol		

25 El contenido de cGMP se analizó utilizando la técnica de radioautografía. La prueba demostró que el contenido de ginsenósido Rg1 pudo bloquear la degradación de cGMP. El mayor contenido de cGMP en los cuerpos cavernosos sólo fue causado por el efecto de inhibición del ginsenósido Rg1 sobre PDE5. El ginsenósido Rg1 y Sildenafil no tuvieron diferencias significativas entre sí en cuanto al efecto de inhibición de PDE5.

30 Se estudió el efecto del ginsenósido Rg1 sobre la mejora de la función sexual de los hombres en algunos voluntarios (varones sanos de 30 a 50 años). Los resultados demostraron que, en el día 5 después de la administración del ginsenósido Rg1 (100 a 200 mg/d), los voluntarios presentaron una sexualidad notablemente mejorada y mayor frecuencia de erección del pene. Por otra parte, excepto por la boca seca, no se produjeron efectos secundarios significativos.

Ejemplo 2

Efecto del ginsenósido Rg1 y sus metabolitos los ginsenósidos Rh1 y/o Ppt sobre la espermatogénesis

5 2.1.1 Materiales y método

2.1.1.1 Preparación del medicamento

10 El ginsenósido Rg1 y sus metabolitos los ginsenósidos Rh1 y/o Ppt se disolvieron en agua bidestilada, respectivamente, y se almacenaron en un ambiente a 4 °C. El gosipol se obtuvo del Laboratory of Synthesis, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, se disolvió en aceite comestible refinado y se almacenó en la oscuridad en un ambiente a 4 °C.

15 2.1.1.2 Animal

Ratones machos adultos Wistar, peso corporal 180 a 200 g, comprados al Laboratory Animal Center of Chinese Academy of Medical Sciences (con el número de certificado SCXK (Jing) 2005-0013).

20 2.1.1.3 Instrumento principal

Evaluación de semen asistida por computadora (CASA), desarrollada por Beijing Spaceflight Ruiqi Science and Technology Co., Ltd. y provista por Peking Union Medical College Hospital.

25 2.1.1.4 Establecimiento del modelo de aspermatogénesis

Se administraron 50 mg/kg de gosipol por vía oral a los ratones, una vez cada dos días, durante dos semanas, mediante lo cual se estableció un modelo de aspermatogénesis.

30 2.1.1.5 Agrupamiento de los animales y régimen de dosificación

Después de cinco días de adaptación al ambiente, los animales se dividieron al azar en 8 grupos de la manera siguiente:

35 Grupo de control: administración oral de aceite comestible cada dos días.
Grupo Modelo: administración oral de 50 mg/kg de gosipol cada dos días.

Grupos del ginsenósido Rg1

40 Grupo de dosis baja: administración de 50 mg/kg de gosipol cada dos días y administración de 5 mg/kg de ginsenósido Rg1 cada dos días.
Grupo de dosis alta: administración de 50 mg/kg de gosipol cada dos días y administración de 10 mg/kg de ginsenósido Rg1 cada dos días.

45 Grupos del metabolito Rh1

Grupo de dosis baja: administración de 50 mg/kg de gosipol cada dos días y administración de 5 mg/kg de metabolito Rh1 cada dos días
Grupo de dosis alta: administración de 50 mg/kg de gosipol cada dos días y administración de 10 mg/kg de metabolito Rh1 cada dos días.

50 Grupos del metabolito Ppt

Grupo de dosis baja: administración de 50 mg/kg de gosipol cada dos días y administración de 5 mg/kg de metabolito Ppt cada dos días.
55 Grupo de dosis alta: administración de 50 mg/kg de gosipol cada dos días y administración de 10 mg/kg de metabolito Ppt cada dos días.

60 El día 14, los ratones se anestesiaron y fijaron. Se tomaron los espermatozoides de la cola del epidídimo, se disolvieron en 3 ml de suero fisiológico y se incubaron a 37 °C durante 5 minutos. Después, se analizó la calidad de los espermatozoides mediante evaluación del semen asistida por computadora (CASA).

2.1.2 Análisis estadístico

65 Los resultados de la prueba se expresaron como $x \pm s$; el análisis estadístico se realizó mediante la prueba t para hacer una comparación entre los diferentes grupos, con $P < 0.05$ como un índice de diferencia significativa.

2.1.3 Resultados de la prueba

2.1.3.1 Influencia del ginsenosido Rg1 y sus metabolitos los ginsenosidos Rh1 y Ppt sobre el recuento de espermatozoides en la cola del epidídimo de ratones, como se muestra en la tabla 6

5

Tabla 6

Influencia del ginsenosido Rg1 y sus metabolitos los ginsenosidos Rh1 y Ppt sobre el recuento de espermatozoides en la cola del epidídimo de ratones			
Grupos	Cantidad de espermatozoides (10^6 ml ⁻¹)	Índice de viabilidad (%)	Movilidad de los espermatozoides (A + B) (%)
Control	145±18**	53±7*	40±8**
Modelo	108±25**	41±8	24±3
Rg1 (5 mg/kg)	170±36**#	50±10*	28±6
Rg1 (10 mg/kg)	225±36**##	61±9**	45±8**
Rh1 (5 mg/kg)	142±24**	56±10**	39±8**
Rh1 (10 mg/kg)	143±16**	52±5**	39±6**
Ppt (5 mg/kg)	141±18**	55±9**	38±11*
Ppt (10 mg/kg)	178±54**	56±7**	39±9**

Los resultados de la tabla 6 demuestran que el ginsenosido Rg1 y sus metabolitos los ginsenosidos Rh1 y Ppt todos pudieron mejorar la calidad disminuida de los espermatozoides causada por el gosipol, con diferencias significativas entre los grupos de administración y el grupo modelo.

* P < 0.05 vs el grupo modelo,

**P < 0.01 vs el grupo modelo,

P < 0.05 vs el grupo de control,

P < 0.01 vs el grupo de control.

(se adjunta: norma OMS para la clasificación de la movilidad de los espermatozoides:

- Grado A - espermatozoides con movilidad rápida y progresiva;
- Grado B - espermatozoides con movilidad progresiva lenta o perezosa;
- Grado C - espermatozoides con movilidad no progresiva;
- Grado de D - espermatozoides inmóviles).

10

2.1.3.4 Influencia del ginsenosido Rg1 sobre el contenido de NO en el tejido testicular de los ratones

15 La prueba se realizó utilizando un kit de NO de Nanjing; los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7

Influencia del ginsenosido Rg1 sobre el contenido de NO en el tejido testicular de los ratones		
Grupos	Tratamiento	Concentración de NO (μ mol/g de proteína)
Control	Aceite	9±6**
Modelo	Gosipol	20±9
Ginsenosido Rg1	5 mg/kg	16±9
	10 mg/kg	10±7**

20

Como se muestra en la tabla 7, el contenido de NO en los testículos de los ratones en el grupo modelo, aumentó significativamente en comparación con el del grupo de control (P < 0.05). No hubo diferencias entre el grupo de dosis baja y el grupo de dosis alta. Se expuso que el contenido de NO en los testículos de los ratones del grupo de dosis alta se redujo significativamente, por lo tanto el ginsenosido Rg1 pudo disminuir el contenido de NO en los testículos, y en consecuencia pudo proteger los espermatozoides. Los valores se expresaron como valor medio ± DE

**P < 0.01 vs. grupo modelo, n = 10.

25

2.1.3.5 influencia del ginsenosido Rg1 sobre el contenido de hormonas (T, FSH y LH) en el suero de ratones

La prueba se realizó mediante radioinmunoensayo, con el uso de un kit comprado por ej. a China North Institute of Biological Technology. Los resultados se muestran en la tabla 8.

5

Tabla 8

Influencia del ginsenosido Rg1 sobre el contenido de hormonas en el suero de los ratones				
Grupos	Tratamiento	T (ng/ml)	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)
Control	Aceite	1.2±0.5**	5.3±0.9	2.7±0.9
Modelo	Gosipol	0.3±0.1	5.3±0.8	2.3±0.4
Ginsenosido	5 mg/kg	0.8±0.3*	5.7±2.0	2.9±1.2
Rg1	10 mg/kg	1.0±0.5**	4.3±1.9	2.1±0.8

10

Los resultados anteriores demostraron que el contenido de testosterona en el suero de los ratones en el grupo modelo se redujo significativamente en comparación con el del grupo de control. La administración del ginsenosido Rg1 (5, 10 mg/kg) pudo aumentar significativamente el contenido de testosterona en el suero de los ratones. El contenido de FSH y LH no tuvo diferencias significativas entre los diferentes grupos (P > 0.05), lo que sugirió que el ginsenosido Rg1 actuó directamente sobre el tejido testicular en el modelo, en lugar de actuar por medio de la ruta neuroendocrina. *P < 0.05 vs. grupo modelo, **P < 0.01 vs. grupo modelo, n = 10.

15

Ejemplo 3

Efecto del ginsenosido Rg1 para mejorar la calidad disminuida de los espermatozoides en ratones seniles

20

Se probó mediante la prueba siguiente que el ginsenosido Rg1 tuvo el efecto de mejorar la calidad disminuida de los espermatozoides en ratones seniles. En la prueba, se utilizaron ratones Kunming de 12 meses de vida. El ginsenosido Rg1 se administró por vía oral en una dosis de 5 mg/kg, una vez por día, durante dos semanas. La calidad de los espermatozoides se determinó por CASA; los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9

Efecto del ginsenosido Rg1 para mejorar la calidad disminuida de los espermatozoides en ratones seniles				
Grupos	Tratamiento	Cantidad de espermatozoides (×10 ⁶)	Movilidad de los espermatozoides (%)	Grado A + B (%)
Ratones seniles	DDW	52.28±32.31	50.98±4.95	16.54±9.55
Ratones seniles + ginsenosido Rg1	5 mg/kg	133.23±15.99**	40±16.56	18.27±8.37

25

Los resultados anteriores demostraron que el recuento de espermatozoides en el grupo de ratones seniles se redujo significativamente en comparación con el del grupo de los ratones seniles + ginsenosido Rg1. Sin embargo, los dos grupos no tuvieron diferencias en términos del porcentaje de movilidad de los espermatozoides y el porcentaje de grado A+B. Se sugirió que el ginsenosido Rg1 podría mejorar la espermatogénesis en ratones seniles. Los valores se expresaron como valor medio ± DE **P < 0.01 vs. el grupo de los ratones seniles, n = 4.

30

Ejemplo 4

Efecto del ginsenosido Rg1 para mejorar la calidad disminuida de los espermatozoides en ratones en condiciones de estrés por frío

35

Se probó mediante la prueba siguiente que el ginsenosido Rg1 pudo mejorar la calidad disminuida de los espermatozoides en ratones, donde la calidad disminuida de los espermatozoides fue consecuencia del estrés por frío. En la prueba, se utilizaron ratones Kunming para establecer un modelo de estrés. Los ratones se colocaron en un ambiente a 4 °C durante 8 horas por día, cada uno se mantuvo en una jaula individual, con ayuno y sin agua, durante 14 días, para así establecer un modelo de estrés por frío. Se les administró ginsenosido Rg1 en dos dosis diferentes, es decir, 5 mg/kg y 10 mg/kg. Cada día, los ratones recibieron por vía oral el medicamento 1 hora antes de la exposición al ambiente frío. Después de 14 días, se determinó la calidad de los espermatozoides por CASA; los resultados se muestran en la tabla 10.

45

Tabla 10

Efecto del ginsenosido Rg1 para mejorar la calidad disminuida de los espermatozoides en ratones debido a estrés por frío

Grupos	Tratamiento	Cantidad de espermatozoides ($\times 10^6$)	Movilidad de espermatozoides (%)	Grado A+B (%)
Control	Agua bidestilada	475.76 \pm 98.58	54.57 \pm 6.15**	39.36 \pm 7.91**
Modelo	Agua bidestilada	454.09 \pm 137.30	38.91 \pm 8.7	25.71 \pm 10.58
Ginsenosido	5 mg/kg	438.70 \pm 94.19	54.47 \pm 8.14**	39.26 \pm 8.96**
Rg1	10 mg/kg	377.17 \pm 42.93	44.97 \pm 12.07	32.89 \pm 13.42

5 Los resultados anteriores demostraron que el estrés por frío repetido pudo reducir la movilidad de los espermatozoides, y el ginsenosido Rg1 en una dosis de 5 mg/kg pudo mejorar la calidad de los espermatozoides, aumentar el porcentaje de movilidad de los espermatozoides y reducir los espermatozoides muertos.

10 Los ejemplos anteriores demostraron que el curso de la espermatogénesis fue regulado principalmente por hormona como la secretada por hipotálamo-hipófisis-testículos. Entre varios factores aparte de la hormona, el óxido nítrico (NO) se convirtió en una de las sustancias importantes que influyen en la espermatogénesis y la capacitación, tuvo una doble función reguladora en términos de espermatogénesis, es decir, una baja concentración de NO pudo estimular la espermatogénesis y la capacitación y aumentar la movilidad de los espermatozoides; mientras que una alta concentración de NO pudo suprimir la espermatogénesis y la movilidad de los espermatozoides.

15 El estudio verificó que el ginsenosido Rg1 pudo reducir el exceso de generación de NO causado por gopipol, mejorando así la calidad disminuida de los espermatozoides inducida por el gopipol. Además, el ginsenosido Rg1 pudo mejorar significativamente la calidad disminuida de los espermatozoides debida a la senilidad y el estrés.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un principio activo elegido entre el ginsenósido Rg1 y sus metabolitos los ginsenósidos Rh1 y Ppt, para tratar la esterilidad en los hombres y mejorar la espermatogénesis en un paciente.
2. La composición farmacéutica para tratar la esterilidad en los hombres y mejorar la espermatogénesis de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha espermatogénesis incluye promover la espermatogénesis, aumentar la cantidad de espermatozoides y/o mejorar la calidad de los mismos.