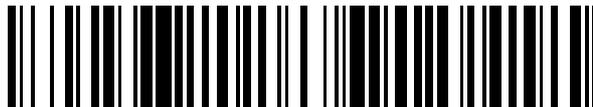


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 751**

51 Int. Cl.:

A61K 36/258 (2006.01)

A61P 15/00 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2008 E 13189406 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2703004**

54 Título: **Composición para mejorar la función sexual masculina que contiene extracto de baya de ginseng**

30 Prioridad:

28.05.2007 KR 20070051593

09.05.2008 KR 20080043488

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

13.07.2015

73 Titular/es:

**AMOREPACIFIC CORPORATION (100.0%)
181, Hangang-ro 2-ga, Yongsan-gu
Seoul 140-777, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, CHAN-WOONG;
YEOM, MYEONG HOON;
CHO, NAM HOON;
LEE, SANG JUN;
LEE, SANG MIN;
LEE, JIN YOUNG;
JEON, HEE YONG;
KIM YOUNG-MYEONG;
KIM, CHUN-KI y
CHOI, YOUNG DEUK**

74 Agente/Representante:

VIGAND, Philippe

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 540 751 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

Composición para mejorar la función sexual masculina que contiene extracto de baya de ginseng.

5 Campo Técnico

La presente divulgación que comprende la invención se refiere a una composición para facilitar la circulación sanguínea, una composición para la prevención del envejecimiento vascular, una composición para el tratamiento de la inflamación vascular, una composición para facilitar la angiogénesis, una composición para el tratamiento de enfermedad cardíaca isquémica, una composición para la mejora y el tratamiento de la insuficiencia circulatoria local, una composición para la mejora de la belleza de la piel, y una composición para la mejora de la función sexual masculina, que comprenden extracto de bayas de ginseng como principio activo. Más particularmente, la presente divulgación que comprende la invención se refiere a composiciones que comprenden extracto de bayas de ginseng como principio activo, que facilitan la generación de óxido nítrico (NO) en las células endoteliales, mejoran la viabilidad de las células endoteliales, aumentan la movilidad de las células endoteliales y facilitan la angiogénesis a través de la formación de tubos vasculares; relajan el cuerpo cavernoso y mejoran la erección del pene al facilitar la generación de NO en las células endoteliales, mejorando así la función sexual masculina; y proporcionen un efecto antioxidante, previenen el envejecimiento de la piel y mejoran las arrugas al facilitar la biosíntesis de colágeno y la prevención de MMP-1, proporcionan un efecto blanqueante de la piel a través de la inhibición de la síntesis de melanina, y proporcionan un efecto hidratante para la piel.

Técnica Antecedente

El ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) es una planta que pertenece al género ginseng, de la familia Araliaceae, y se ha usado como hierba desde hace más de 2.000 años en Corea, China, Japón y otros países. Empíricamente, se ha usado para prevenir enfermedades y prolongar la vida. Hasta ahora, se sabe que el ginseng tiene los siguientes efectos: efecto positivo sobre el sistema nervioso central, efecto anti-carcinogénico, actividad anticancerígena, control de la función inmune, efecto antidiabético, efecto de mejora de la función hepática, mejora del trastorno cardiovascular, efecto anti-arterioesclerótico, control de la presión arterial, mejora del climaterio, mejora en las afecciones osteoporóticas, efectos antiestrés y antifatiga, efecto antioxidante, efecto de prevención del envejecimiento, y similares [The Recent Korean Ginseng: Constituents and Effects, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, 56-112, 1996].

Los ginsenósidos, que son los compuestos activos típicos del ginseng, se distribuyen uniformemente en las partes aéreas y subterráneas de la planta. En particular, se sabe que no sólo el contenido, sino también las composiciones de ginsenósidos son diferentes dependiendo de las partes de la raíz de ginseng a la hoja del ginseng y a la baya de ginseng (Attele AS y col., Biochem. Pharmacol., 58; 1685-1693, 1999). Entre ellos, se indica que la baya del ginseng proporciona un efecto antidiabético superior a la raíz del ginseng, con un contenido y composición de ginsenósidos característicos (Dey L. y col., Phytomedicine, 10; 600-605, 2003).

Desde tiempos antiguos, la baya de ginseng se ha valorado más valiosa que otras partes del ginseng. Se ha seleccionado y cosechado para obtener semillas. La recolección de semillas de la baya del ginseng se realiza solamente una vez cuando el ginseng tiene 4 años de edad. Es difícil producir buenas plantas jóvenes a partir del ginseng de 3 años, porque las semillas son demasiado pequeñas. Las semillas recolectadas de ginseng 5 o más años de edad son fuertes, pero la raíz del ginseng puede no crecer lo suficiente, y es difícil producir ginseng rojo de alta calidad ya que el tejido no es tan denso. Y, si la recolección de semillas se realiza 2 o más veces, la cantidad y calidad del ginseng rojo se deterioran significativamente [The Recent Korean Ginseng: Cultivation, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, 130-131, 1996].

Con respecto a la circulación sanguínea, la dilatación de los capilares es esencial particularmente en la circulación sanguínea periférica. Es decir, el aumento del flujo sanguíneo en los vasos sanguíneos es imposible sin la dilatación de los vasos sanguíneos. Con respecto a la dilatación de vasos sanguíneos, el NO está implicado por la acción del eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial). Por lo tanto, en el caso de hipertensión, la generación de NO disminuye [Forete, P. y col., Basal nitric acid synthesis in essential hypertension. Lancet. 1997; 349: 837-842]. Otros factores, tales como el envejecimiento, el tabaquismo, la hiperlipemia y la diabetes reducen la generación de NO en los vasos sanguíneos [Crossman, DC. More problems with endothelium. Q J Med. 1997; 90: 157-160].

La angiogénesis es un proceso que implica el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes. Se produce en varias etapas la migración de las células endoteliales que constituyen los vasos

sanguíneos, la invasión a través de la matriz extracelular (MEC), que es una barrera intercelular, la proliferación y la diferenciación en vasos sanguíneos (formación de tubos) [Folkman, J. y col., *Angiogenesis. The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(16), 10931-10934].

5 Fisiológicamente, la angiogénesis se produce durante el desarrollo embrionario o la menstruación y puede tener lugar temporalmente debido a la deficiencia de oxígeno local. La angiogénesis terapéutica se utiliza en caso de que el flujo sanguíneo sea insuficiente como en una enfermedad isquémica, una fractura ósea, etc. Por todo el mundo, las enfermedades cardiovasculares isquémicas causadas por la arteriosclerosis son la principal causa de muerte, y también está aumentando rápidamente en Corea [Jeong, Jin-Ok y col., *Therapeutic angiogenesis. Journal of Korean Society for Vascular Surgery*. 2000. 16(2), 265-269].

15 La 1-arginina es un aminoácido básico con la fórmula química $C_6H_{14}N_4O_2$ y un peso molecular de 174,21. En primer lugar, se aisló de un extracto de plántula de altramuz (un tipo de haba). La 1-arginina es uno de los aminoácidos que constituyen las proteínas. Es rico en la proteína protamina, que existe en el esperma de peces, y existe en estado libre en las semillas de las plantas. Además, es un componente importante en el ciclo de la urea (también conocida como el ciclo de ornitina). Por la acción de la enzima arginasa, se descompone en urea y ornitina. Se sintetiza a partir de citrulina y ácido aspártico. Aunque la 1-arginina es un aminoácido no esencial en adultos, es nutricionalmente básica en niños pequeños.

20 La NO-nitro-1-arginina se conoce como un inhibidor de óxido nítrico sintasa. Las investigaciones muestran que la NO-nitro-1-arginina puede interferir con la relajación de los vasos sanguíneos. Sin embargo, otras investigaciones muestran que el efecto de inhibición de la NO-nitro-1-arginina puede invertirse en presencia de 1-arginina (3×10^{-3} mol/l) [Simonsen y col., *Nitric oxide is involved in the inhibitory neurotransmission and endothelium-dependent relaxations of human small penial arteries*, *Clin. Sci.* 92: 3, 265-75]. Este estudio afirma que la 1-arginina puede ser un sustrato eficaz para el óxido nítrico sintasa y puede estimular la liberación de NO libre en los vasos sanguíneos.

Los aspectos de la función sexual masculina incluyen deseo sexual, erección del pene, eyaculación y orgasmo. Esta función sexual está determinada por complicadas interacciones fisiológicas de los sistemas nervioso, endocrino y circulatorio. Un trastorno en cualquiera de ellos puede dar como resultado disfunción sexual. Hasta hace apenas 30 unos 10 años, la disfunción sexual se ha considerado resultado de motivos psicógenos. Sin embargo, con el desarrollo de la ciencia médica moderna, se ha descubierto que la disfunción sexual está causada por diversas razones, incluyendo trastornos en los sistemas circulatorio, nervioso y endocrino, diabetes, hipertensión, consumo de drogas y similares en aproximadamente el 50 % de los pacientes. Recientemente, el sildenafil, que es un inhibidor de la fosfodiesterasa V, está generando mucho de interés con respecto al tratamiento de la disfunción sexual. Pero, esta terapia sólo induce la erección temporalmente usando un producto químico, y es costosa y está relacionada con una gran cantidad de reacciones adversas, incluyendo dolor de cabeza, aumento de la presión arterial, ataque cardíaco, y similares. Especialmente, no son pocos los casos de muerte notificados asociados con ataques al corazón. Por consiguiente, se requiere un tratamiento seguro y eficaz que pueda mejorar la función eréctil fundamentalmente. La tendencia reciente apunta hacia el desarrollo de un tratamiento de la disfunción sexual que 35 aumenta la producción de NO y cGMP, que son sustancias de transducción de señal que inducen una fuerte relajación del músculo liso cavernoso y, de este modo, se mejora la erección del pene.

Los cambios que se producen durante la erección del pene son complicados y requieren un control altamente coordinado que implica el sistema nervioso periférico y central y el sistema endocrino. La contracción del músculo 45 liso cavernoso se controla por la estimulación nerviosa noradrenérgica a través de la activación del receptor adrenérgico α_1 postsináptico, y la disfunción eréctil puede estar relacionada con el aumento de la tensión del músculo liso cavernoso. Sin embargo, la relajación del músculo liso del pene está mediada en parte por la neurotransmisión no-adrenérgica, no-colinérgica (NANC), y la disminución de la tensión del músculo liso cavernoso del pene está causada por la relajación del cuerpo cavernoso por NO. Durante la excitación sexual, se libera NO de 50 las neuronas y las células endoteliales, se une a la guanilato ciclasa soluble (sGC) existente en las células musculares lisas y las células endoteliales y lo activan, y, de este modo, aumenta el nivel de guanosín 3'-,5'-monofosfato cíclico (cGMP) en las células. A través de un mecanismo desconocido, aunque se cree que está asociado la activación de la proteína cinasa G, el aumento del nivel de cGMP induce la relajación del cuerpo cavernoso reduciendo el nivel de calcio en las células (es probable que esté causado por la activación del canal de 55 K^+ activado por Ca^{2+}) [Chuang y col., *cGMP mediates corpus cavernosum smooth muscle relaxation with altered cross-bridge function. Life Sci.* 1998; 63(3): 185-94].

La presente invención se define por las reivindicaciones. Los inventores de la presente invención han descubierto que el extracto de baya de ginseng, que es la parte aérea del ginseng, tiene una composición y efecto diferentes de

otras partes, incluyendo la raíz del ginseng o la raíz del ginseng rojo.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para la mejora de la función sexual masculina a través de un aumento de la generación de NO, que es una sustancia de transducción de señal que induce una fuerte relajación del músculo liso cavernoso, y, así, una mejora de la erección del pene, que comprende extracto de bayas de ginseng como principio activo.

Solución Técnica

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para la mejora de la función sexual masculina que comprende extracto de bayas de ginseng como principio activo. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para la mejora de la función sexual masculina que comprende extracto de bayas de ginseng como principio activo y que comprende adicionalmente 1-arginina.

15 Efectos Ventajosos

La composición que comprende extracto de bayas de ginseng de acuerdo con la presente invención dilata los vasos sanguíneos, facilitando de este modo la circulación sanguínea, inhibe el envejecimiento vascular, trata la inflamación vascular, es útil en el tratamiento de enfermedades cardíacas isquémicas, tales como arteriosclerosis, angina de pecho e infarto de miocardio al facilitar la angiogénesis, y es útil en la mejora y tratamiento de la insuficiencia circulatoria local causada por una inflamación artrítica o fractura. Adicionalmente, tiene un efecto superior en la inhibición del envejecimiento de la piel, en la mejora de arrugas cutáneas, en el blanqueamiento de la piel y en la hidratación para la piel. Por lo tanto, puede prepararse un nutracéutico para mejorar la belleza de la piel usando la composición de acuerdo con la presente invención. Además, el extracto de bayas de ginseng de acuerdo con la presente invención aumenta la generación de NO en las células endoteliales y, por lo tanto, proporciona la posibilidad de mejorar la erección del pene. Este efecto puede mejorarse adicionalmente cuando se usa en combinación con 1-arginina, que es un sustrato de óxido nítrico sintetasa. Por consiguiente, una composición que comprende extracto de bayas de ginseng y 1-arginina como principio activo puede mejorar eficazmente la función sexual masculina.

30

Descripción de los Dibujos

Los anteriores y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

35

La figura 1a es una imagen por microscopía láser confocal de las células endoteliales, y la figura 1b compara la intensidad de la fluorescencia con la del grupo no tratado;

la figura 2a muestra la proliferación de las células endoteliales supervivientes, y la figura 2b compara la absorbancia de las células endoteliales teñidas;

40

la figura 3a muestra la movilidad de las células endoteliales teñidas, y la figura 3b compara la movilidad de las células con la del grupo no tratado;

la figura 4a muestra células endoteliales teñidas fijadas, y la figura 4b compara la longitud de los tubos con la del grupo no tratado;

45

la figura 5a es una imagen por microscopio óptico que muestra nuevos vasos capilares que se extienden desde el anillo aórtico, y la figura 5b muestra el efecto promotor de brotes de vasos evaluado midiendo la longitud y el número de vasos recién formados;

la figura 6a es una imagen por microscopía intravital de fluorescencia en tiempo real de la angiogénesis en un ratón, y la figura 6b muestra el cambio en los vasos sanguíneos analizado usando un programa informático (0: menor número de cambios, 5: mayor número de cambios);

50

la figura 7 compara la inhibición de la generación de NO inducida por LPS;

la figura 8 compara la generación de NO y los factores inflamatorios PGE2, TNF- α e IL1- β en sangre de ratón;

la figura 9 muestra la actividad de eliminación de especies reactivas de oxígeno de sustancias de ensayo;

la figura 10 muestra la generación de colágeno del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1;

55

la figura 11 muestra el efecto en la inhibición de la síntesis de MMP-1 del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1;

la figura 12 muestra el efecto en la inhibición de las arrugas del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1;

la figura 13 muestra el efecto en la disminución de las arrugas del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1;

la figura 14 es una imagen por microscopía láser confocal que muestra el efecto de facilitar la generación de NO de la 1-arginina, el extracto de ginseng rojo y el extracto de bayas de ginseng en las células endoteliales;

5 la figura 15 es una gráfica que muestra el efecto de facilitar la generación de NO de la 1-arginina, el extracto de ginseng rojo y el extracto de bayas de ginseng en las células endoteliales según la intensidad relativa de fluorescencia; y

la figura 16 es una gráfica que muestra el efecto sinérgico de facilitar la generación de NO del extracto de bayas de ginseng y la 1-arginina según la fluorescencia relativa.

10 Mejor Modo

En lo sucesivo en el presente documento, se hará referencia en más detalle a la presente invención. La composición de la presente invención comprende extracto de bayas de ginseng como principio activo con el fin de mejorar la erección del pene a través de un aumento de la generación de NO en las células endoteliales y, de este modo, mejorar la función sexual masculina, y puede comprender adicionalmente 1-arginina.

Para mejorar la función sexual masculina, es necesario facilitar la erección del pene a través de una fuerte relajación del cuerpo cavernoso. Se relaciona con el aumento de la generación de NO. En experimentos con animales, se descubrió que el NO desempeña una función importante en la erección del pene. Con la estimulación sexual, la generación de NO en las células endoteliales aumenta en la periferia parasimpática del pene. El NO activa la guanilato ciclasa, que convierte el guanosín trifosfato (GTP) en guanosín monofosfato cíclico (cGMP). El cGMP resultante proporciona una señal que desencadena la relajación del músculo liso cavernoso y la arteria del pene, induciendo de este modo la erección del pene. Por consiguiente, la generación de NO es crítica para mantener la erección del pene. Por lo tanto, un uso combinado de 1-arginina, que es el sustrato de óxido nítrico sintasa, y el material que facilita la generación de NO en los vasos sanguíneos desencadenará una liberación suficiente de NO en el cuerpo cavernoso, induciendo así la relajación del músculo liso, un flujo constante de sangre y el tratamiento de la disfunción eréctil.

La composición para la mejora de la función sexual masculina de acuerdo con la presente invención puede comprender el 0,01-100 % en peso de extracto de bayas de ginseng en base al peso total de la composición, dependiendo del tipo de composición. Y, cuando se usa 1-arginina en combinación, la 1-arginina puede incluirse en una cantidad del 0,01-99,9 % en peso en base al peso total de la composición.

La composición que comprende extracto de bayas de ginseng de la presente invención puede usarse como aditivo para alimentos, medicinas, y similares.

Cuando se usa en medicinas, la composición que comprende extracto de bayas de ginseng como principio activo de acuerdo con la presente invención puede prepararse en forma sólida, semisólida o líquida para su administración oral o parenteral, añadiendo un vehículo inorgánico u orgánico usado habitualmente.

Las formas de preparación para administración oral pueden incluir un comprimido, píldora, gránulo, cápsula blanda/dura, polvo, gránulo fino, emulsión, jarabe, pastilla, y similares. Las formas de preparación para administración parenteral pueden incluir inyección, gotas, pomada, loción, pulverización, suspensión, emulsión, supositorio, y similares. El principio activo de la presente invención puede prepararse en una forma de preparación mediante un método usando habitualmente en la técnica. Pueden usarse adecuadamente un tensioactivo, excipiente, colorante, fragancia, conservante, estabilizante, tampón, agente de suspensión u otros adyuvantes.

La composición de la presente invención puede prepararse en una formulación farmacéutica de acuerdo con un método usado habitualmente. Al preparar la formulación, es preferible que el principio activo se mezcle o se diluya con un vehículo, o se encapsule en un vehículo de tipo receptáculo. En caso de usar un diluyente como vehículo, puede ser una sustancia sólida, semisólida o líquida que actúe como vehículo, excipiente o medio para el principio activo.

Los ejemplos de vehículo, excipiente o diluyente adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, silicato cálcico, celulosa, metil celulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. La formulación puede incluir adicionalmente carga, antifloculante, lubricante, humectante, fragancia, emulsionante, antiséptico, o similares. La composición de la presente invención puede formarse por el método bien conocido en la técnica de manera que el principio activo pueda liberarse de manera inmediata, sostenida o controlada después de administrarse a un

mamífero.

La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse a través de diversas rotas, incluyendo por vía oral, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, a través de aplicación tópica, usando un parche, o iontoforética. Entre ellas, se prefieren aplicación tópica y administración oral.

Para un ser humano, una dosificación diaria del principio activo puede ser de 1 a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 5 a 70 mg/kg de peso corporal. La administración puede hacerse una vez o varias veces al día. Sin embargo, la dosificación real del principio activo debe determinarse considerando diversos factores, incluyendo la enfermedad particular que se va a tratar, la ruta de administración, la edad, el sexo y el peso corporal del paciente, la gravedad de la enfermedad, y similares. Por consiguiente, la dosificación de administración que se ha mencionado anteriormente no limita en modo alguno el alcance de la presente invención.

Cuando se usa como alimento funcional, la composición que comprende extracto de bayas de ginseng como principio activo de acuerdo con la presente invención puede prepararse en un comprimido, cápsula, cápsula blanda, píldora, gránulo, bebida, barrita dietética, chocolate, caramelo, dulce, etc., añadiendo un componente usado habitualmente en la técnica relacionada. Además, pueden añadirse adecuadamente ingredientes funcionales adecuados para alimentos funcionales.

20 Modo para la Invención

Los siguientes ejemplos y ejemplos comparativos ilustran la presente invención en más detalle, pero no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

25 Ejemplo 1: Preparación de extracto de bayas de ginseng

- 1) Pretratamiento de baya de ginseng: Las semillas se separaron y se retiraron de la baya de ginseng cruda cosechada. La pulpa y el pericarpio de la baya de ginseng se secaron usando la luz solar o aire caliente para obtener una baya de ginseng seca.
- 2) Preparación de extracto de bayas de ginseng: Después de añadir 3 l de etanol a 1 kg de bayas de ginseng seca, se obtuvieron 300 g de extracto de bayas de ginseng por extracción con calentamiento a reflujo seguido de filtración y concentración a presión reducida a 40-45 °C.

35 Ejemplo 2: Preparación de extracto de bayas de ginseng

- 1) 100 g del extracto de bayas de ginseng obtenido en el Ejemplo 1 se disolvieron en 1 l de agua. Los constituyentes solubles en aceite se retiraron usando un embudo de separación, añadiendo 500 ml de éter dietílico. Después, a la capa acuosa restante se le añadieron 500 ml de butanol saturado en agua. Este procedimiento se repitió 3 veces. La capa de butanol resultante se concentró a presión reducida para obtener 60 g de extracto de bayas de ginseng (saponina en bruto).

Ejemplo Comparativo 1: Preparación de extracto de raíz de ginseng

Se preparó extracto de raíz de ginseng de una manera similar al Ejemplo 1, excepto que se usó raíz de ginseng rojo en lugar de baya de ginseng.

Ejemplo de Ensayo 1: Comparación de los componentes del extracto de bayas de ginseng y extracto de raíz de ginseng

50 1. Análisis del componente ginsenósido (saponina de ginseng)

Cada uno del extracto de bayas de ginseng y el extracto de raíz de ginseng preparados en el Ejemplo 1 y el Ejemplo Comparativo 1, respectivamente, se trató con éter para eliminar los constituyentes solubles en aceite. Después, la saponina en bruto se extrajo con butanol (BuOH) y se concentró. El análisis del componente ginsenósido (saponina de ginseng) se realizó usando HPLC. El resultado se da en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

	Ejemplo 1	Ejemplo Comparativo 1
Contenido de saponina en bruto (saponina de ginseng total, peso en seco)	33,42 %	16,70 %
PD/PT	0,73	3,23

El extracto de bayas de ginseng preparado en el Ejemplo 1 tenía aproximadamente el doble de saponina en bruto en comparación con el extracto de raíz de ginseng preparado en el Ejemplo Comparativo 1. Las composiciones de ginsenósidos del extracto de bayas de ginseng y el extracto de raíz de ginseng serán claramente diferentes, como puede observarse a partir de la relación de PD (protopanaxadiolos; ginsenósidos Rb1, Rb2, Rc y Rd) y PT (protopanaxatriolos; ginsenósidos Re, Rg1 y Rg2), que era de 0,73 y 3,23, respectivamente.

2. Análisis del componente mineral del extracto de bayas de ginseng

10

Se realizó el análisis de componentes, suponiendo que el extracto de bayas de ginseng preparado en el Ejemplo 1 incluye componentes vitamínicos y minerales que no se incluyen o apenas se incluyen en la raíz de ginseng. El resultado se da en la siguiente Tabla 2.

15

Tabla 2

Componentes	Contenido	Componentes	Contenido
Potasio (mg/100 g)	5865,57	Magnesio (mg/100 g)	354,38
Calcio (mg/100 g)	819,26	Cinc (mg/100 g)	178,49
Hierro (mg/100 g)	59,31	Vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$, RE)	213,11
Fósforo (mg/100 g)	187,17	Vitamina B ₁ (mg/100 g)	12,29
Vitamina B ₂ (mg/100 g)	8,45	Vitamina B ₆ (mg/100 g)	10,50
Vitamina C (mg/100 g)	4,91	Vitamina E (mg/100 g, α -TE)	23,61
Vitamina K ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	232,12	Niacina (mg/100 g, NE)	5,76
Ácido pantoténico (mg/100 g)	5,87	Ácido fólico ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	349,97

Como se ha observado anteriormente, el extracto de bayas de ginseng de acuerdo con la presente invención contiene más saponinas de ginseng que el extracto de raíz de ginseng. Los componentes de saponina incluidos en la baya de ginseng son bastante diferentes de los de la raíz de ginseng. También se confirmó que el extracto de bayas de ginseng incluye 16 vitaminas y minerales en mayor cantidad a diferencia de la raíz de ginseng. En base a estos hallazgos, se realizaron los siguientes experimentos para confirmar su efecto en los vasos sanguíneos.

20

Ejemplo de Ensayo 2: Generación de NO en HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana)

La eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial) existe en las células endoteliales humanas. El aumento de la actividad de eNOS da como resultado la generación de NO, dilatando de este modo los vasos sanguíneos y facilitando la circulación de la sangre. Las células endoteliales humanas se cultivaron y se trataron con extracto de bayas de ginseng (Ejemplos 1 y 2) y extracto de raíz de ginseng rojo (Ejemplo Comparativo 1). Se comparó la cantidad de generación de NO.

30

Las células endoteliales se adhirieron sobre una placa de 24 pocillos recubierta con gelatina, con una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo. Las células se cultivaron durante 12 horas usando medio de cultivo. Las células endoteliales se pretrataron durante 12 horas, usando extracto de bayas de ginseng o extracto de raíz de ginseng rojo (Ejemplos 1-2, Ejemplo Comparativo 1). Después, se trataron, incluyendo el grupo no tratado, con $10\ \mu\text{mol/l}$ de DAF-FM diacetato (Molecular Probe, OR) a $37\ ^\circ\text{C}$ durante 30 minutos en medio M199 libre de FBS. Posteriormente, las células endoteliales se lavaron 3 veces con medio M199 libre de FBS, se pusieron en una cámara de flujo de placas paralelas y se estimularon con luz aislada de una lámpara de mercurio. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm. Se emite una fluorescencia de 515 nm cuando DAF se une con NO. La figura 1a es una imagen por microscopía láser confocal (Atto Bioscience, Estados Unidos) de las células endoteliales, y la figura 1b compara la intensidad de la fluorescencia analizada usando el software Image-Pro Plus v 4.5 (Media Cybernetics, San Diego, CA, Estados Unidos) con la del grupo no tratado.

40

Como se observa en la figura 1, los extractos de bayas de ginseng de los Ejemplos 1 y 2 de acuerdo con la presente invención mostraron del 1300 % al 2000 % de generación de NO a $100\ \mu\text{g/ml}$, en comparación con el grupo no tratado. Por el contrario, el extracto de raíz de ginseng rojo del Ejemplo Comparativo 1 mostró aproximadamente del

45

100 % al 200 % de generación de NO a la misma concentración de 100 ug/ml. En particular, el extracto del Ejemplo 2 mostró más generación de NO. Por consiguiente, se confirmó que el extracto de bayas de ginseng proporciona un efecto de generación de NO significativamente mejor en las células endoteliales que el extracto de raíz de ginseng rojo. La excelente capacidad de generación de NO de los extractos de bayas de ginseng de los Ejemplos 1 y 2 da como resultado la dilatación de los vasos sanguíneos y facilita la circulación sanguínea.

Ejemplo Comparativo 3: Viabilidad de las células endoteliales

La etapa más básica para prevenir el envejecimiento de los vasos sanguíneos y facilitar la angiogénesis es la activación de las células endoteliales. La mejora de la viabilidad de las células endoteliales se comparó entre el grupo de control positivo (VEGF; factor de crecimiento endotelial vascular) y los grupos tratados con extracto de bayas de ginseng (Ejemplos 1 y 2).

La viabilidad de las células endoteliales se midió por tinción de cristal violeta. Las células endoteliales se adhirieron sobre una placa de 24 pocillos, a 5×10^4 células/pocillo, y se cultivaron durante 12 horas usando medio de cultivo. Después, tras el tratamiento durante 6 horas con medio M199 que contenía suero al 1 %, igualando de este modo el ciclo celular, las células se trataron con los extractos de bayas de ginseng de los Ejemplos 1 y 2 a 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, o con la sustancia de control positivo. Después de 18 a 24 horas, el medio se retiró y se añadieron 300 μl de tinción de cristal violeta para teñir las células endoteliales vivas. Después de dejar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos, las células se lavaron 2-3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se lisaron con solución de SDS al 1 %. La absorbancia a 550 nm se comparó entre el grupo de control positivo y los grupos de tratamiento de los Ejemplos 1 y 2 para medir la viabilidad de las células.

La figura 2a muestra las células endoteliales supervivientes, y la figura 2b compara la absorbancia de las células endoteliales teñidas. Como se observa en la figura 2a y la figura 2b, los grupos de tratamiento con extracto de bayas de ginseng (Ejemplos 1 y 2) mostraron una mejor viabilidad de las células endoteliales y una mejor proliferación celular que el grupo no tratado. Especialmente, el Ejemplo 2 mostró una viabilidad de las células endoteliales incluso mayor que el grupo de control positivo (VEGF). Por lo tanto, se confirmó que el extracto de bayas de ginseng mejora la viabilidad de las células endoteliales y facilita la proliferación de las mismas, previniendo de este modo el envejecimiento de los vasos sanguíneos y facilitando la angiogénesis.

Ejemplo Comparativo 4: Mejora de la movilidad de las células endoteliales (migración de las HUVEC)

La movilidad celular se midió y se analizó como una medida de la angiogénesis. El análisis de movilidad celular se realizó usando una cámara de Boyden (Transwell). A una placa de 24 pocillos se le añadieron 600 μl de medio M199 libre de suero. Después del tratamiento del medio con extracto de bayas de ginseng (Ejemplos 1 y 2; 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) o la sustancia de control positivo, se aplicó gelatina (1 mg/ml) sobre la superficie inferior del transwell y se adhirieron 2×10^4 células sobre la superficie superior. Aproximadamente 4 horas más tarde, las células sobre la superficie superior se eliminaron usando un hisopo, y las células que migraron a la superficie inferior se contaron después de la tinción con hematoxilina y eosina. La figura 3a muestra la movilidad de las células endoteliales teñidas, y la figura 3b compara la movilidad de las células con la del grupo no tratado.

Como se observa en la figura 3, los Ejemplos 1 y 2 mostraron el efecto de la mejora de la movilidad de las células endoteliales. Especialmente, el Ejemplo 2 mostró mejor que la sustancia de control positivo VEGF. Por consiguiente, puede concluirse que el extracto de bayas de ginseng mejora la movilidad de las células endoteliales vasculares, que es uno de los mecanismos clave en la angiogénesis.

Ejemplo Comparativo 5: Facilitación de la formación de tubos de células endoteliales

Como una medida de la capacidad de control de la angiogénesis, se midió el grado de formación de tubos por las células. En general, la formación de tubos de células se ensaya usando Matrigel. Se recubrieron 250 μl de Matrigel sobre una placa de 24 pocillos y se adhirieron $2,5 \times 10^4$ células sobre el Matrigel. Con intervalos de tiempo predeterminados, se observó la formación de tubos para el grupo no tratado, el grupo de control positivo (VEGF) y los grupos tratados con extracto de bayas de ginseng (Ejemplos 1 y 2). En el momento apropiado, las células se fijaron y se tiñeron, y el grado de formación de tubos se analizó usando un programa informático. La figura 4a muestra las imágenes de las células fijadas y teñidas, y la figura 4b compara la longitud de los tubos con la del grupo no tratado.

Como se observa en la figura 4, los Ejemplos 1 y 2 mostraron el efecto de facilitar la formación de tubos, que es uno

de los mecanismos claves en la angiogénesis. Especialmente, el Ejemplo 2 mostró mejor efecto que la sustancia de control positivo.

Ejemplo Comparativo 6: Facilitación del brote de vasos

5

Como una medida de la capacidad de control de la angiogénesis, se observó el brote de vasos. Se usaron ratas SD, y los grupos de ensayo se dividieron en un grupo no tratado, un grupo tratado con VEGF, y grupos tratados con extracto de bayas de ginseng (Ejemplos 1 y 2). Los anillos aórticos obtenidos de las ratas SD se almacenaron en medio DMEM libre de suero. El medio en el que cada uno de los anillos aórticos se almacenó, se trató con VEGF o

10

extracto de bayas de ginseng (Ejemplos 1 y 2). Durante el cultivo a 37 °C durante aproximadamente 7 días, se observó el brote de vasos sanguíneos. La figura 5a es una imagen por microscopio óptico que muestra nuevos vasos capilares que se extienden desde el anillo aórtico, y la figura 5b muestra el efecto promotor de brotes de vasos evaluado midiendo la longitud y el número de vasos recién formados.

15

Como se observa en la figura 5, el extracto de bayas de ginseng (Ejemplos 1 y 2) mostró el efecto de la facilitación del brote de vasos. Especialmente, el Ejemplo 2 mostró mejor efecto que la sustancia de control positivo. Esto indica que el extracto de bayas de ginseng facilita la angiogénesis.

Ejemplo Comparativo 7: Facilitación de la angiogénesis

20

Se anestesió un ratón BALB/c macho de aproximadamente 6 a 8 semanas de edad usando una solución al 1,5 % de isoflurano y O₂/N₂O. En el abdomen del ratón, se implantó una cámara de ventana de titanio (diámetro = 19 mm, diámetro interno = 14 mm, espesor = 0,7 mm). Cada uno de 20 ng de VEGF, como control, y el extracto de bayas de ginseng (Ejemplos 1 y 2) se mezcló con Matrigel y se puso en el tejido en el interior de la ventana. El cubreobjetos

25

de cubrió y se fijó con un anillo de fijación. La angiogénesis se observó en tiempo real a través de microscopía intravital de fluorescencia. 4 días más tardes, se inyectaron 50 µl de dextrano (MW 250.000, Sigma Chemical, St. Louis, Missouri) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en la vena de la cola a una concentración de 25 mg/ml, para confirmar el grado de angiogénesis. La figura 6a es una imagen por microscopía intravital de fluorescencia en tiempo real (microscopio Zeiss Axiovert 200M, Oberkocchen, Alemania) tomada con una cámara

30

CCD de multiplicación de electrones (Photon Max 512; Princeton Instruments, Trenton, NJ) usando luz azul (excitación a 440-475 nm, emisión a 530-550 nm), y la figura 6b muestra el cambio en los vasos sanguíneos analizado usando el programa informático MetaMorph (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA) (0: menor número de cambios, 5: mayor número de cambios).

35

Como se observa en la figura 6, el extracto de bayas de ginseng (Ejemplos 1 y 2) mostró un efecto angiogénico en un animal. Especialmente, el Ejemplo 2 mostró un mejor efecto angiogénico que la sustancia de control positivo. Por consiguiente, puede confirmarse que el extracto de bayas de ginseng es eficaz al facilitar la angiogénesis y, por lo tanto, es eficaz en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular isquémica, la mejora de la circulación local y el tratamiento de la inflamación vascular crónica.

40

Ejemplo Comparativo 8: Control de la inflamación vascular

1. Efecto de la inhibición de la generación de NO inducida por LPS en macrófagos (*in vitro*)

45

El efecto de la inhibición de la generación de NO inducida por LPS en macrófagos se ensayo para confirmar el efecto de la inhibición de la inflamación vascular del extracto de bayas de ginseng.

Los macrófagos (células Raw 264.7) se cultivaron en un medio que contenía suero al 10 % en la condición de CO₂ al 5 %. Después del cultivo en una incubadora de placas de 96 pocillos a una concentración de 2 x 10⁵ células/pocillo y

50

la estimulación con LPS (1 ug/ml), las células se trataron con extracto de bayas de ginseng (Ejemplos 1 y 2) o extracto de raíz de ginseng rojo (Ejemplo Comparativo 1), respectivamente. Después de mantener a 37 °C durante 1 hora, se midió el grado de generación de NO para comparar el efecto de la inhibición de la generación de NO inducida por LPS. La generación de NO se midió usando la reacción de Griess [Minghetti, L. y col., 1991, Glia 19. 152-160]. El resultado se muestra en la figura 7.

55

Como se observa en la figura 7, el extracto de bayas de ginseng de acuerdo con la presente invención (Ejemplos 1 y 2) inhibió de forma eficaz la generación de NO, como citocina, y el efecto fue notablemente superior al del extracto de raíz de ginseng rojo (Ejemplo Comparativo 1). Especialmente, el Ejemplo 1 mostró un mejor efecto. Por consiguiente, puede confirmarse que los extractos de bayas de ginseng de acuerdo con la presente invención

(Ejemplos 1 y 2) son eficaces en el alivio de la inflamación vascular y el tratamiento de enfermedad isquémica relacionada con la inflamación vascular, tal como angina de pecho.

2. Efecto de control de la inflamación vascular (*in vivo*)

5

En base al resultado experimental en el nivel celular, el efecto del control de la inflamación vascular se ensayó en un modelo animal. Los ratones se agruparon en un grupo no tratado, un grupo inducido por LPS y grupos tratados con extracto de bayas de ginseng (Ejemplos 1 y 2), con 5 ratones por cada grupo.

10 Se diluyeron 100 mg de cada uno de los extractos de bayas de ginseng preparados en los Ejemplos 1 y 2 por 1 kg de peso corporal de ratón (1,5 mg/15 g de peso corporal de ratón) en 1 ml de solución salina (NaCl al 0,9 %). Esta solución se inyectó tres veces por vía intra-abdominal desde el día 1 hasta el día 3. 2 horas después de la inyección el día 3, se inyectó por vía intra-abdominal LPS diluido en 1 ml de solución salina a una concentración de aproximadamente 4 mg por kg de peso corporal de ratón para inducir la inflamación. Después de aproximadamente
15 12 horas, el abdomen del ratón se abrió, se recogió sangre de la arteria del corazón y se almacenó a -40 °C. La sangre se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos y, después de la centrifugación a 4 °C, 3.000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se mantuvo a -20 °C. La generación de NO se determinó a partir de la sangre, y los factores inflamatorios PGE2, TNF- α e IL1- β se identificaron por transferencia de Western. El resultado se muestra en la figura 8.

20

Como se observa en la figura 8, el extracto de bayas de ginseng (Ejemplos 1 y 2) mostró el efecto de la inhibición de la inflamación inducida por LPS. Especialmente, el Ejemplo 1 mostró mejor efecto. Esto indica que el extracto de bayas de ginseng es eficaz en la inhibición de la inflamación vascular y, de este modo, en el control de la inflamación vascular en una enfermedad isquémica.

25

Ejemplo Comparativo 9: Inhibición del envejecimiento de la piel y mejora de las arrugas

1) Efecto antioxidante

30 El efecto antioxidante se investigó comparando la capacidad de eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas en las células por radiación ultravioleta (UV). Se usó Trolox, que se usa habitualmente para comparar el efecto antioxidante, como sustancia de control positivo. Y se usó extracto de ginseng rojo con fines de comparación, y se usó el grupo no tratado como grupo de control (figura 9).

35 Como se observa en la figura 9, el extracto de bayas de ginseng de acuerdo con la presente invención (Ejemplo 1) eliminó significativamente las ROS generadas por radiación UV en un sistema de cultivo monocapa de queratinocitos humanos HaCaT, en comparación con el grupo de control. El efecto fue comparable al de trolox, que se usó como índice de la actividad antioxidante. Por el contrario, el extracto de ginseng rojo no mostró un efecto eliminador significativo. Por consiguiente, puede confirmarse que el extracto de bayas de ginseng de la presente
40 invención (Ejemplo 1) elimina significativamente ROS, que es una causa del envejecimiento de la piel y, por lo tanto, es eficaz en la prevención de arrugas, la disminución de la elasticidad de la piel, la pigmentación, y similares.

2) Ensayo de procolágeno de tipo I

45 Se cultivaron fibroblastos humanos en una incubadora de placas de 12 pocillos a una concentración de 10^5 células/pocillo. Después, el medio se reemplazó por uno que incluía 1 ppm o 10 ppm del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1. El 3^{er} día de cultivo, las células se cosecharon y la cantidad de procolágeno de tipo I producido se analizó usando ELISA. El resultado se calculó como un valor relativo en base al grupo de control, que no se trató con una sustancia de ensayo. Se usó TGF- β (factor de crecimiento transformante- β) como sustancia de
50 control positivo.

En un sistema de cultivo monocapa normal de fibroblastos humanos, el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 mostró un efecto distinto para facilitar la generación de procolágeno de tipo I en comparación con el grupo de control. Es decir, puede confirmarse que el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 puede inhibir la reducción de
55 la generación de colágeno debido al envejecimiento de la piel humana y puede mejorar las arrugas (figura 10).

3) Inhibición de la expresión de MMP-1

Se cultivaron fibroblastos humanos en una incubadora de placas de 12 pocillos a una concentración de 10^5

células/pocillo. Después, tras la irradiación con UVB a 40 mJ/cm², el medio se reemplazó por uno que incluía 1 ppm o 10 ppm del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1. El 2º día de cultivo, las células se cosecharon y la cantidad de MMP-1 (metaloproteinasa de matriz I) producida se analizó usando ELISA. El resultado se calculó como un valor relativo en base al grupo de control, que se irradió con UV sin tratamiento con la sustancia de ensayo. Se usó TGF-β (factor de crecimiento transformante-β) como sustancia de control positivo.

En un sistema de cultivo monocapa normal de fibroblastos humanos, el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 inhibió significativamente la expresión de MMP-1 inducida por radiación UVB a 40 mJ/cm². Es decir, puede confirmarse que el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 puede inhibir la biosíntesis de MMP-1, que es la enzima implicada en la ruptura del tejido de la piel, inducida por factores de envejecimiento internos o externos y, por lo tanto, es eficaz en la prevención del envejecimiento de la piel y la mejora de las arrugas (figura 11).

4) Inhibición de la biosíntesis de ciclooxigenasa-2 (COX-2) inducida por UV

15 Se cultivaron fibroblastos humanos en una incubadora de placas de 12 pocillos a una concentración de 10⁵ células/pocillo. Después, tras la irradiación con UVA a 15 J/cm², el medio se reemplazó por uno que incluía cada uno de 0,1 ppm, 1 ppm o 10 ppm del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 o el extracto de raíz de ginseng rojo del Ejemplo Comparativo 1. El 2º día de cultivo, las células se cosecharon y la cantidad de COX-2 producida se analizó usando transferencia de Western. El resultado se calculó como un valor relativo en base al grupo de control, que se irradió con UV sin tratamiento con la sustancia de ensayo, usando un densitómetro. El resultado se da en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3

Sustancia de ensayo (ppm)	Biosíntesis de COX-2 (%)	
Ejemplo 1	10	11
	1	38
	0,1	63
Ejemplo Comparativo 1	10	72
	1	91
	0,1	99
Control	100	

25 Como se observa a partir de la Tabla 3, el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 disminuyó la biosíntesis de COX-2 inducida por UV de una manera dependiente de la concentración. Como resultado, puede prevenirse la ruptura del tejido de la piel por la prostaglandina E2 (PGE2) derivada de COX-2.

5) Inhibición de la biosíntesis del factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) inducida por UV

30 Se cultivaron queratinocitos humanos en una incubadora de placas de 12 pocillos a una concentración de 10⁵ células/pocillo. Después, tras la irradiación con UVB a 30 mJ/cm², el medio se reemplazó por uno que incluía cada uno de 0,1 ppm, 1 ppm o 10 ppm del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 o el extracto de ginseng rojo del Ejemplo Comparativo 1. Después de 6 a 24 horas de cultivo, las células se cosecharon y la cantidad de TNF-α se analizó usando ELISA (Pharmingen 555212). El resultado se calculó como un valor relativo en base al grupo de control, que se irradió con UV sin tratamiento con la sustancia de ensayo. El resultado se da en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4

Sustancia de ensayo (ppm)	Síntesis de TNF-α (%)	
Ejemplo 1	10	16
	1	38
	0,1	72
Ejemplo Comparativo 1	10	74
	1	85
	0,1	92
Control	100	

40 Como se observa a partir de la Tabla 4, el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención disminuyó la biosíntesis de TNF-α inducida por UV en una manera dependiente de la concentración. Por lo tanto, se confirmó que el extracto de bayas de ginseng puede prevenir el envejecimiento de la piel, que puede

causarse por la biosíntesis de TNF- α .

6) Inhibición del envejecimiento de la piel

- 5 Se seleccionaron ratones sin pelo como modelo animal para evaluar si la composición de la presente invención tiene efecto de prevención del envejecimiento de la piel. Se agruparon ratones hembra de 6 a 7 semanas de edad como un grupo de alimentación (control) y un grupo de alimentación normal + extracto de bayas de ginseng (Ejemplo 1), con 10 ratones por cada grupo. Después de 12 semanas de administración oral, los ratones se irradiaron con UV.
- 10 Las arrugas de la piel antes y después de la irradiación UV se compararon en la misma zona usando el sistema Visiometer (C+K). El cambio en las arrugas de la piel se calculó mediante la siguiente Figura Matemática 1. El resultado se muestra en la figura 12.

Figura Matemática 1

$$15 \quad \text{Cambio en las arrugas } (\Delta\%) = \frac{T_{di} - T_{do}}{T_{do}} \times 100$$

donde T_{di} es el valor de medición el Día 90, y T_{do} es el valor de medición el Día 0.

Como se observa en la figura 12, el grupo de ensayo al que se dio alimentación normal y el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 mostró 130 ± 51 % (media \pm desviación estándar) del aumento de arrugas de la piel, mientras que el grupo de control al que se dio alimentación normal mostró 230 ± 49 % del aumento de arrugas de la piel. Por lo tanto, el grupo de ensayo mostró un mejor efecto de inhibición del envejecimiento de la piel (figura 12).

7) Mejora de las arrugas

- 25 Se seleccionaron ratones sin pelo como modelo animal para evaluar si la composición de la presente invención proporciona el efecto de mejorar las arrugas existentes. Se agruparon ratones hembra de 6 a 7 semanas de edad como un grupo de alimentación normal (control) y un grupo de alimentación normal + extracto de bayas de ginseng (Ejemplo 1), con 10 ratones por cada grupo. Después de la irradiación con UV para inducir arrugas en la piel, a los ratones se les administró por vía oral el alimento y el extracto durante 12 semanas.

Las arrugas en la piel antes y después de la administración oral se compararon en la misma zona usando el sistema Visiometer (C+K). El cambio en las arrugas en la piel se calculó mediante la siguiente Figura Matemática 2. El resultado se muestra en la figura 13.

Figura Matemática 2

$$35 \quad \text{Cambio en las arrugas } (\Delta\%) = \frac{T_{di} - T_{do}}{T_{do}} \times 100$$

donde T_{di} es el valor de medición el Día 90, y T_{do} es el valor de medición el Día 0.

40 Como se observa en la figura 13, el grupo de ensayo al que se dio alimentación normal y el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 mostró 98 ± 17 % (media \pm desviación estándar) de disminución de arrugas en la piel, mientras que el grupo de control al que se dio alimentación normal mostró 35 ± 22 % de disminución de arrugas en la piel. Por lo tanto, el grupo de ensayo mostró un mejor efecto de mejora de arrugas de la piel.

Ejemplo Comparativo 10: Efecto blanqueante de la piel

1) Inhibición de la generación de melanina en melanocitos de ratón

- 50 Se evaluó la inhibición de la generación de melanina en melanocitos de ratón para confirmar el efecto del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 para inhibir la generación de melanina.

En primer lugar, se cultivaron melanocitos (células Mel-Ab) obtenidos a partir de un ratón C57BL/6 [Dooley, T.P. y col., Skin Pharmacol., 7, págs. 188-200] en DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) que incluía FBS al 10 %, 2-O-tetradecanoilforbol-13-acetato 100 nM y toxina del cólera 1 nM en la condición de 37 °C, CO₂ al 5%. Las células

Mel-Ab cultivadas se separaron usando tripsina-EDTA al 0,25 % y se cultivaron en una placa de 24 pocillos a una concentración de 10^5 células/pocillo. Desde el día 2, se añadieron 10 ppm del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 durante 3 días consecutivos. Se usó extracto de ginseng rojo para fines comparativos, y se usó hidroquinona como sustancia de control positivo. Después, tras la eliminación del medio y el lavado con PBS, las 5 células se disolvieron con hidróxido sódico 1 N. La absorbancia se midió a 400 nm, y la relación de inhibición de la generación de melanina se calculó mediante la siguiente Figura Matemática 3. El resultado se da en la siguiente Tabla 5 (método de Dooley).

Figura Matemática 3

$$10 \quad \text{Relación de inhibición de generación de melanina (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Absorbancia de la sustancia de ensayo}}{\text{Absorbancia de control}} \times 100 \right)$$

Tabla 5

Sustancia de ensayo	Relación de inhibición de generación de melanina (%)
Ejemplo 1 (100 ppm)	69
Ejemplo 1 (10 ppm)	37
Ejemplo 1 (1 ppm)	10
Control (extracto de ginseng rojo, 10 ppm)	5
Control positivo (hidroquinona, 10 ppm)	39

Como se observa a partir de la Tabla 5, el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 mostró una relación de 15 inhibición de la generación de melanina mejor que el extracto de ginseng rojo (grupo de control) y comparable con la hidroquinona (control positivo).

2) Efecto blanqueante de la piel a través de administración oral

20 Se seleccionó una cobaya de color marrón como modelo animal para confirmar si la composición de la presente invención proporciona efecto blanqueante de la piel como nutraceutico. Se irradiaron los animales en todos los grupos de ensayo (10 animales por cada grupo) con UV y se midió la dosis eritemática mínima. Todos los animales se irradiaron con UV a la dosis eritemática mínima durante 3 días, una vez al día. Los animales de ensayo se dividieron en un grupo de alimentación normal, un grupo de alimentación normal + extracto de ginseng rojo, y un 25 grupo de alimentación normal + extracto de bayas de ginseng (Ejemplo 1). Se dejó que los animales se alimentasen libremente durante 5 semanas. Se evaluó la pigmentación midiendo el valor L (brillo) con un colorímetro, y calculando la diferencia entre el valor L cada día y el de antes de la irradiación UV. El resultado se da en la siguiente Tabla 6.

30

Tabla 6

Radiación UV	Alimentación normal	Alimentación normal + extracto de ginseng rojo	Alimentación normal + Ejemplo 1
1 semana más tarde	7,03 ± 0,28	6,90 ± 0,48	6,92 ± 0,30
2 semanas más tarde	6,61 ± 0,31	6,50 ± 0,11	6,04 ± 0,18
3 semanas más tarde	6,42 ± 0,26	5,91 ± 0,26	4,56 ± 0,25
4 semanas más tarde	6,16 ± 0,45	5,66 ± 0,11	3,44 ± 0,16
5 semanas más tarde	6,01 ± 0,49	5,42 ± 0,23	2,88 ± 0,15

Como se observa a partir de la Tabla 6, el grupo de ensayo al que se administró el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención mostró una rápida reducción del cambio del valor L. Esto significa que, en el grupo al que se administró el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 de acuerdo con la presente 35 invención, la piel oscurecida recuperó la coloración original más rápido que el grupo al que se dio el extracto de ginseng rojo. Se confirmó que el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención proporciona un efecto blanqueante de la piel superior con respecto al extracto de ginseng rojo.

Ejemplo Comparativo 11: Efecto hidratante de la piel

1) Facilitación de la capacidad de producción de ácido hialurónico

5 El ácido hialurónico es una proteína de unión que mantiene la humedad en el espacio intercelular y está relacionada directamente con el efecto hidratante para la piel.

Se cultivaron células epidérmicas humanas y el medio se reemplazó por un medio para el cultivo de células epidérmicas (grupo de control) o uno que incluía el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1. En las mismas
10 condiciones, las células se cultivaron durante 48 horas. Después, la cantidad de ácido hialurónico en los dos grupos se comparó usando un kit de medición de ácido hialurónico. El resultado se dio como valor relativo en base al grupo de control.

Tabla 7

Sustancia de ensayo	Concentración	Facilitación de la producción de ácido hialurónico (%)
Ejemplo 1	100 ppm	189
	10 ppm	134
	1 ppm	112
Control	-	100

15

Como se observa a partir de la Tabla 7, el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 facilitó la producción de ácido hialurónico en las células epidérmicas. Por lo tanto, se confirmó que el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención proporciona un efecto hidratante para la piel.

20 2) Efecto hidratante para la piel a través de la administración oral

Se seleccionaron ratones sin pelo como modelo animal para evaluar si la composición de la presente invención proporciona un efecto hidratante para la piel. Se agruparon ratones hembra de 6 a 7 semanas de edad en un grupo de alimentación normal, un grupo de alimentación normal + extracto de ginseng rojo, y un grupo de alimentación
25 normal + extracto de bayas de ginseng (Ejemplo 1), con 10 ratones por cada grupo. Después de 12 semanas de administración oral, la cantidad de ácido hialurónico en la epidermis y la dermis se comparó usando un kit de medición de ácido hialurónico. El resultado se da en la siguiente Tabla 8.

Tabla 8

	Alimentación normal	Alimentación normal + extracto de ginseng rojo	Alimentación normal + Ejemplo 1
Contenido de ácido hialurónico (µg/g)	502,80 ± 16,24	539,33 ± 36,11	617,89 ± 20,21

30

Como se observa a partir de la Tabla 8, el grupo de ensayo al que se administró el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1 mostró un aumento en el contenido de ácido hialurónico en la epidermis y la dermis. El efecto hidratante para la piel fue superior que en el grupo al que se administró una alimentación normal y el grupo al que se administró alimentación normal y extracto de ginseng rojo.

35

Ejemplo de Ensayo 12: Aumento de la generación de NO en las células endoteliales

Se observó el aumento de generación de NO, que se conoce como una sustancia de transducción de señal importante relacionada con la erección del pene, en las células endoteliales después del tratamiento con extracto de bayas de ginseng. El experimento se realizó de una manera similar al Ejemplo de Ensayo 2, pero se trató conjuntamente con 1-arginina. La figura 14 es una imagen por microscopía láser confocal (Atto Bioscience, Estados Unidos), y la figura 15 es una gráfica de intensidad relativa de fluorescencia analizada con el software Image-Pro Plus v 4.5 (Media Cybernetics, San Diego, CA, Estados Unidos). En la figura 14 y la figura 15, "con" significa control, "RG" significa el grupo tratado con extracto de ginseng rojo del Ejemplo Comparativo 1, "GB" significa el grupo
40 tratado con el extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1, "RG 50" significa el grupo tratado con extracto de ginseng rojo 50 µg/ml, "RG 100" significa el grupo tratado con extracto de ginseng rojo 100 µg /ml, "L-arginina 250" significa
45

el grupo tratado con 1-arginina 250 μ M, "L-arginina 500" significa el grupo tratado con 1-arginina 500 μ M, "GB 50" significa el grupo tratado con extracto de bayas de ginseng 50 μ g/ml, y "GB 100" significa el grupo tratado con extracto de bayas de ginseng 100 μ g/ml.

5 Como se observa a partir de la figura 14 y la figura 15, cuando se trataron con extracto de bayas de ginseng, las células endoteliales (HUVEC) mostraron un aumento significativo de la generación de NO en un sistema de cultivo monocapa, en comparación con el grupo de control. El efecto fue dependiente de la concentración. A una concentración de 100 μ g/ml, el grupo de ginseng rojo mostró un aumento de aproximadamente 1,5 veces de la generación de NO con respecto al grupo de control. La 1-arginina, que el sustrato de óxido nítrico sintasa, aumentó
10 la generación de NO en aproximadamente 2,7 veces y 5,5 veces, a 250 μ M y 500 μ M, respectivamente. Por el contrario, el extracto de bayas de ginseng aumentó la generación de NO, que es una sustancia de transducción de señal de la dilatación de los vasos sanguíneos, en aproximadamente 4 veces y 12 veces, en comparación con el grupo de control, a 50 μ g/ml y 100 μ g/ml, respectivamente. Es decir, el extracto de bayas de ginseng mostró el mejor efecto. El extracto de bayas de ginseng fue aproximadamente 8 veces más eficaz que el extracto de ginseng rojo, a
15 una concentración de 100 μ g/ml.

Por lo tanto, puede confirmarse que, la ingesta del extracto de bayas de ginseng da como resultado un aumento de la generación de NO en las células endoteliales y, por lo tanto, puede mejorar la erección del pene a través de la dilatación de los vasos sanguíneos en el cuerpo cavernoso.

20

Ejemplo de Ensayo 13: Efecto sinérgico para facilitar la generación de NO tras el uso combinado de extracto de bayas de ginseng y 1-arginina

Se observó si una combinación de 1-arginina, que se conoce como el sustrato de óxido nítrico sintasa, y el extracto
25 de bayas de ginseng, que facilita la generación de NO, proporciona un efecto sinérgico para facilitar la generación de NO.

Se aislaron células endoteliales del cordón umbilical y se cultivaron. Se midió la generación de NO en las células endoteliales cultivadas. El procedimiento experimental específico fue el mismo que en el Ejemplo de Ensayo 12. El
30 resultado se muestra en la figura 16.

En la figura 16, "con" significa control, "L-arginina 500" significa 1-arginina 500 μ M, "GB 100" significa extracto de bayas de ginseng 100 μ g/ml, y "L-arginina + GB" significa 1-arginina 500 μ M + extracto de bayas de ginseng
35 100 μ g/ml.

Como se observa en la figura 16, la generación de NO aumentó mucho más cuando las células endoteliales se trataron con 100 μ g/ml de extracto de bayas de ginseng y 1-arginina 500 μ M al mismo tiempo, que cuando se trataron con cualquiera de los dos. Es decir, se confirmó un efecto sinérgico.

40 A parte de este resultado, puede confirmarse que un uso combinado de 1-arginina, que es el sustrato de óxido nítrico sintasa, y el extracto de bayas de ginseng aumenta en gran medida la generación de NO y, por lo tanto, es eficaz en la mejora de la función sexual masculina a través de la relajación del cuerpo cavernoso y mejora y mantiene la erección del pene.

45 A continuación se describen algunos ejemplos de formulación de la composición de la presente invención. Sin embargo, se describen con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo de Formulación 1: Inyección

50 Se mezclaron 50 mg del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1, una cantidad adecuada de agua esterilizada para inyección, y una cantidad adecuada de ajustador de pH y se cargaron en una ampolla (2 ml) de acuerdo con un método de preparación de inyección habitual.

Ejemplo de Formulación 2: Líquido

55

Se disolvieron 100 mg del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 2, 10 g de glucosa isomerizada y 5 g de manitol en una cantidad adecuada de agua purificada. Después de añadir una cantidad adecuada de aroma de limón y mezclar los ingredientes, se añadió agua purificada para preparar 100 ml. El líquido resultante se cargó en una

botella de color pardo y se esterilizó.

Ejemplo de Formulación 3: Cápsula blanda

5 Se mezclaron 50 mg del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1, 80-140 mg de 1-carnitina, 180 mg de aceite de semilla de soja, 2 mg de aceite de palma, 8 mg de aceite vegetal endurecido, 4 mg de cera de abejas de color amarillo, y 6 mg de lecitina y se cargaron en una cápsula de acuerdo con un método habitual, con 400 mg por cada cápsula.

10 Ejemplo de Formulación 4: Comprimido

Se mezclaron 50 mg del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 2, 200 mg de galactooligosacárido, 60 mg de lactosa y 140 mg de maltosa y se granularon usando un secador de lecho fluido. Después, tras la adición de 6 mg de éster de azúcar, la mezcla se preparó en comprimidos usando una máquina de fabricación de comprimidos.

15

Ejemplo de Formulación 5: Gránulo

Se mezclaron 50 mg del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 2, 250 mg de glucosa anhidrocrystalina y 550 mg de almidón y se granularon usando un granulador de lecho fluido.

20

Ejemplo de Formulación 6: Bebida

Se mezclaron 50 mg del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1, 10 g de glucosa, 0,6 g de ácido cítrico y 25 g de jarabe de oligosacárido. Después de añadir 300 ml de agua purificada, se cargaron 200 ml de la mezcla en una 25 botella. Después, la esterilización se realizó a 130 °C durante 4-5 segundos.

Ejemplo de Formulación 7: Extracto de baya de ginseng 100 %

30 Durante el proceso de preparación del extracto de bayas de ginseng en el Ejemplo 1, el extracto se concentró de manera que el contenido sólido fue del 60 % o mayor. Después de la maduración a baja temperatura, se preparó el producto líquido de extracto al 100 %.

Ejemplo de Formulación 8: Píldora

35 Se mezclaron 0,9 g del extracto de bayas de ginseng del Ejemplo 1, 0,3 g de azúcar, 1,91 g de almidón y 0,56 g de glicerina y se prepararon en píldoras usando una máquina de fabricación de píldoras.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende extracto de bayas de *Panax ginseng* C.A. Meyer como principio activo para su uso terapéutico en la mejora de la función sexual masculina.
5
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende adicionalmente L-arginina.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1,
10 en la que la composición comprende del 0,01-100 % en peso del extracto de bayas de ginseng en base al peso total de la composición.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2,
15 en la que la composición comprende del 0,01-99,9 % en peso de L-arginina en base al peso total de la composición.
5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición aumenta la generación de óxido nítrico (NO) en las células endoteliales vasculares.
6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la
20 composición mejora la erección del pene.
7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
25 en la que la composición está en la forma de preparación de de un comprimido, píldora, bolita, cápsula, gránulo, polvo, pomada, bebida o inyección.

Figura 1

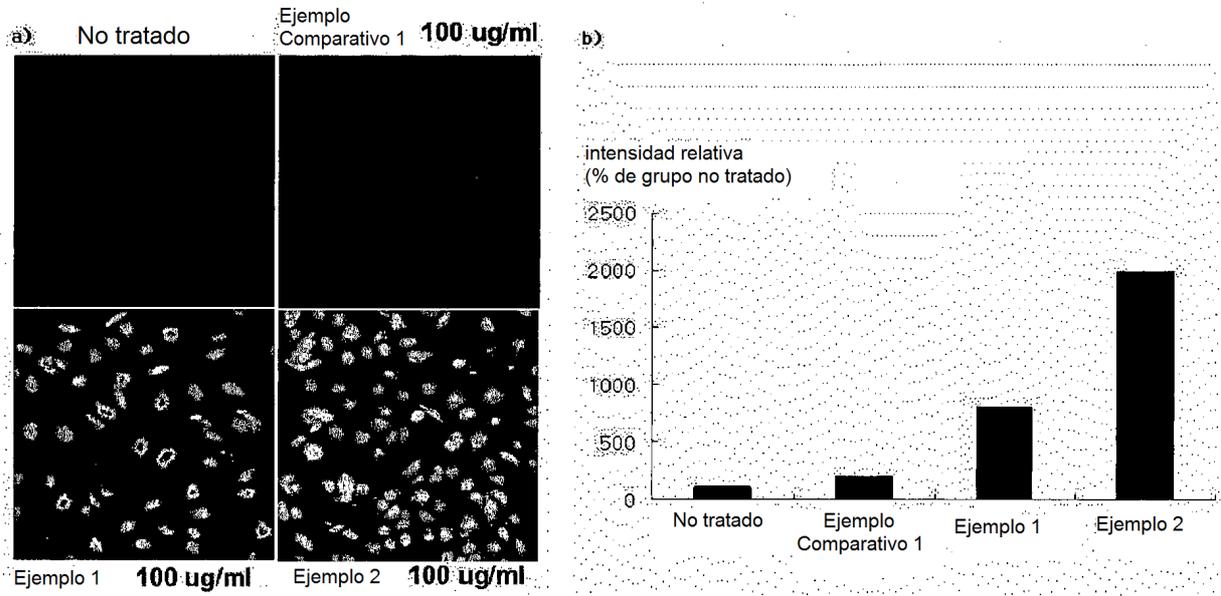


Figura 2

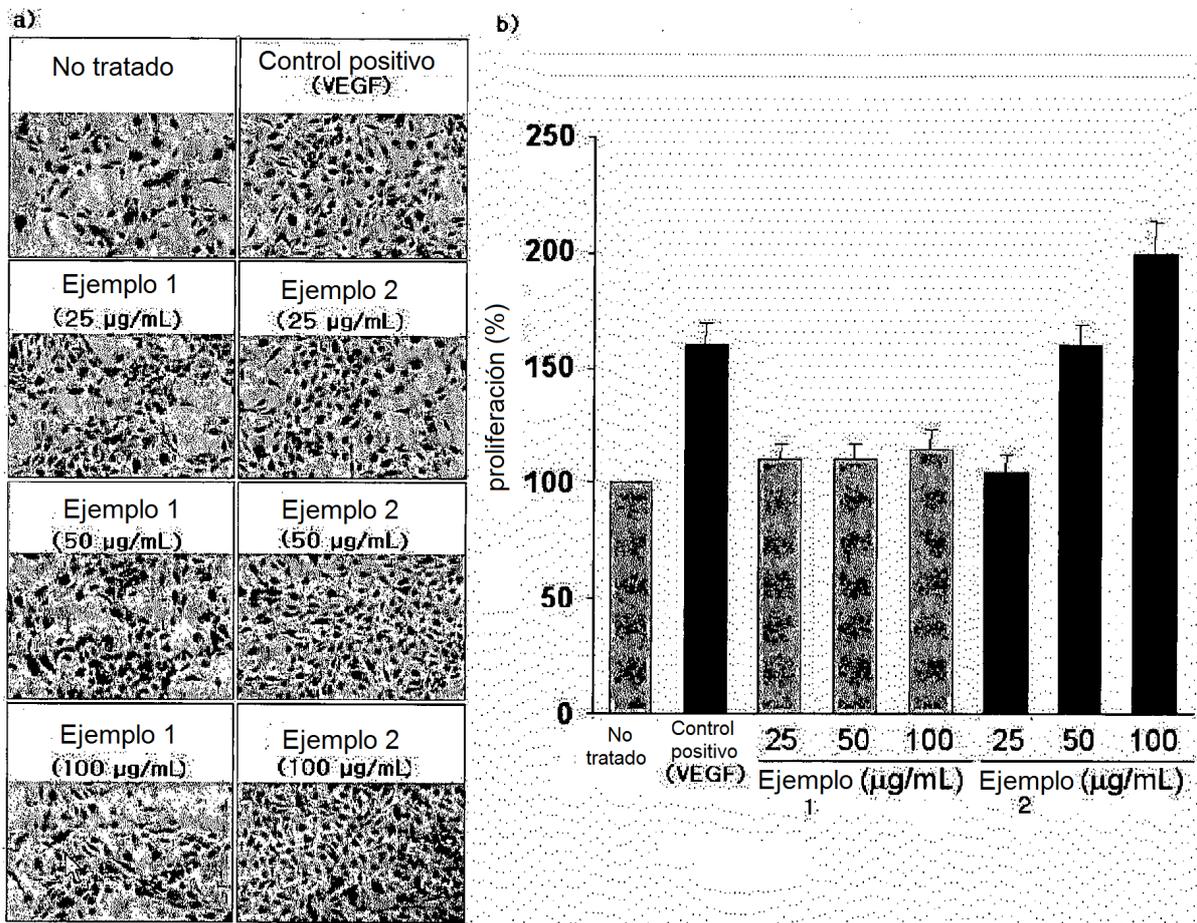


Figura 3

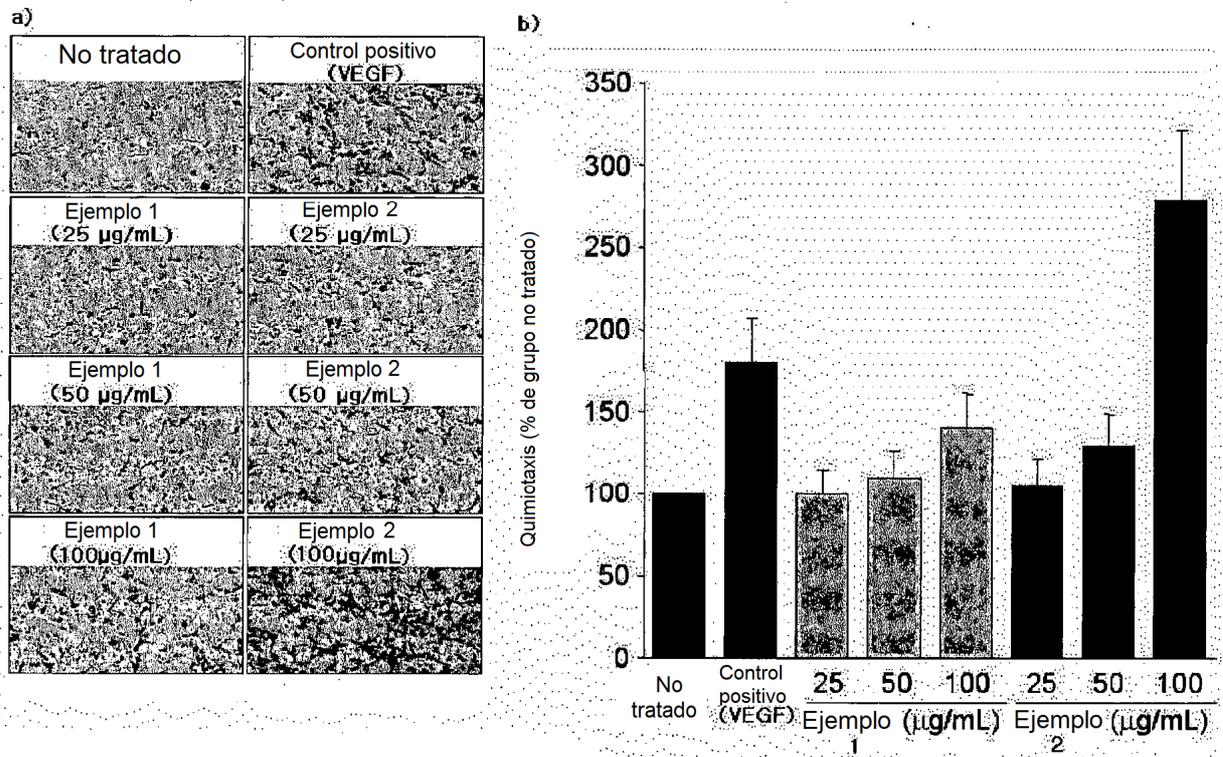


Figura 4

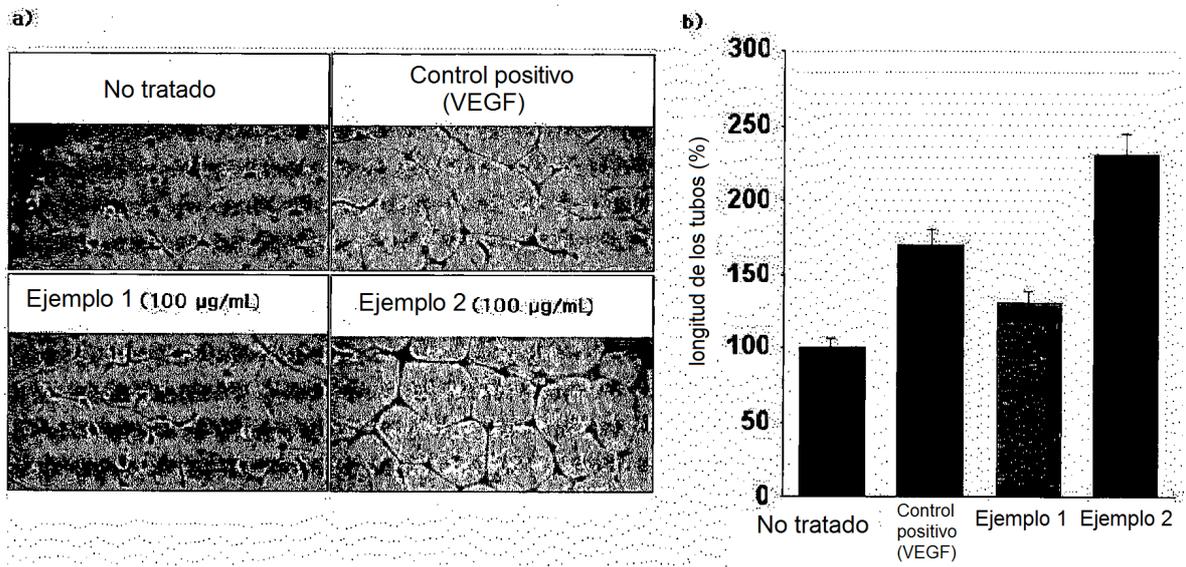


Figura 5

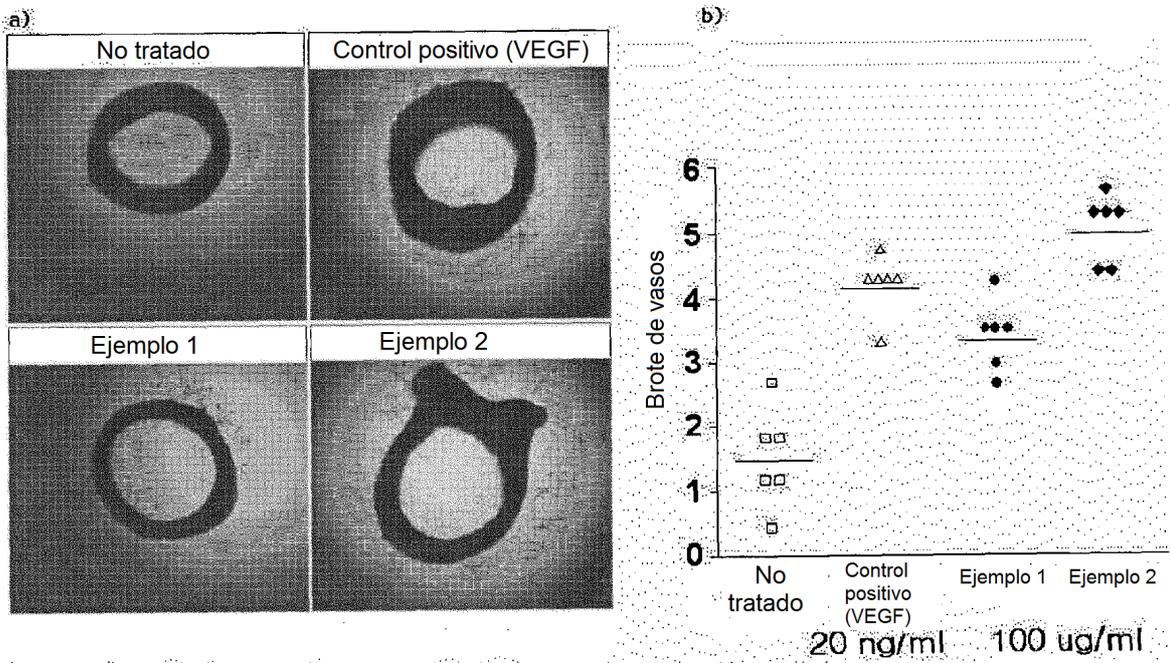


Figura 6

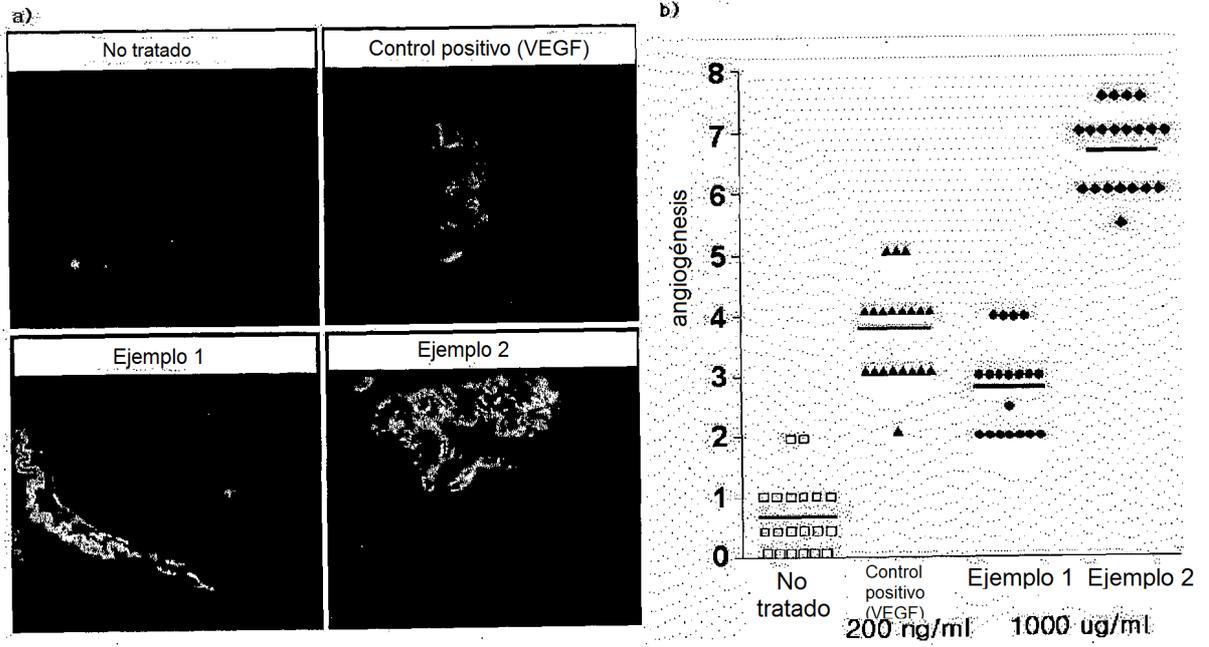


Figura 7

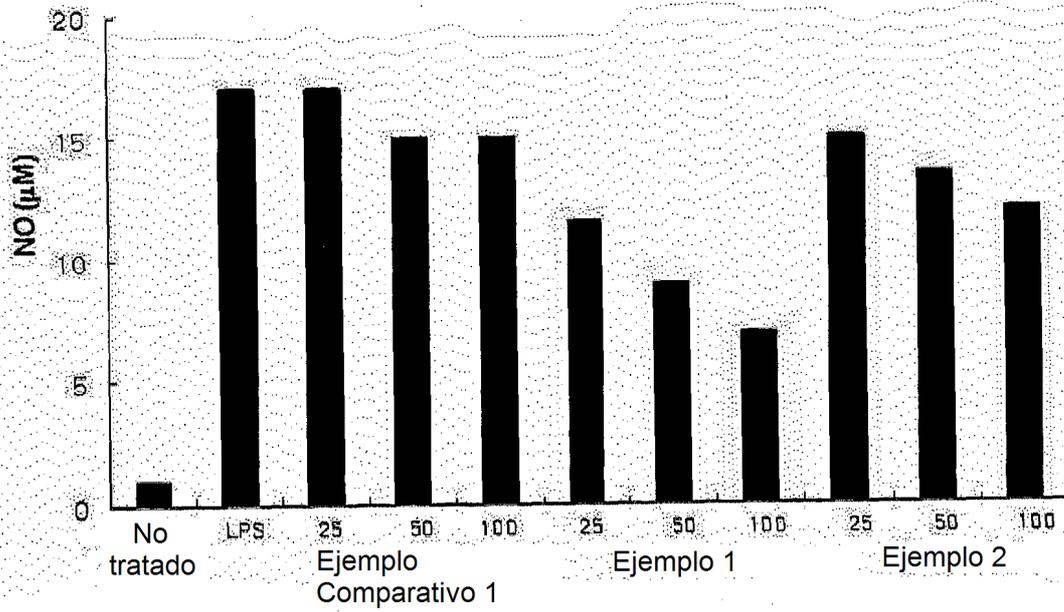


Figura 8

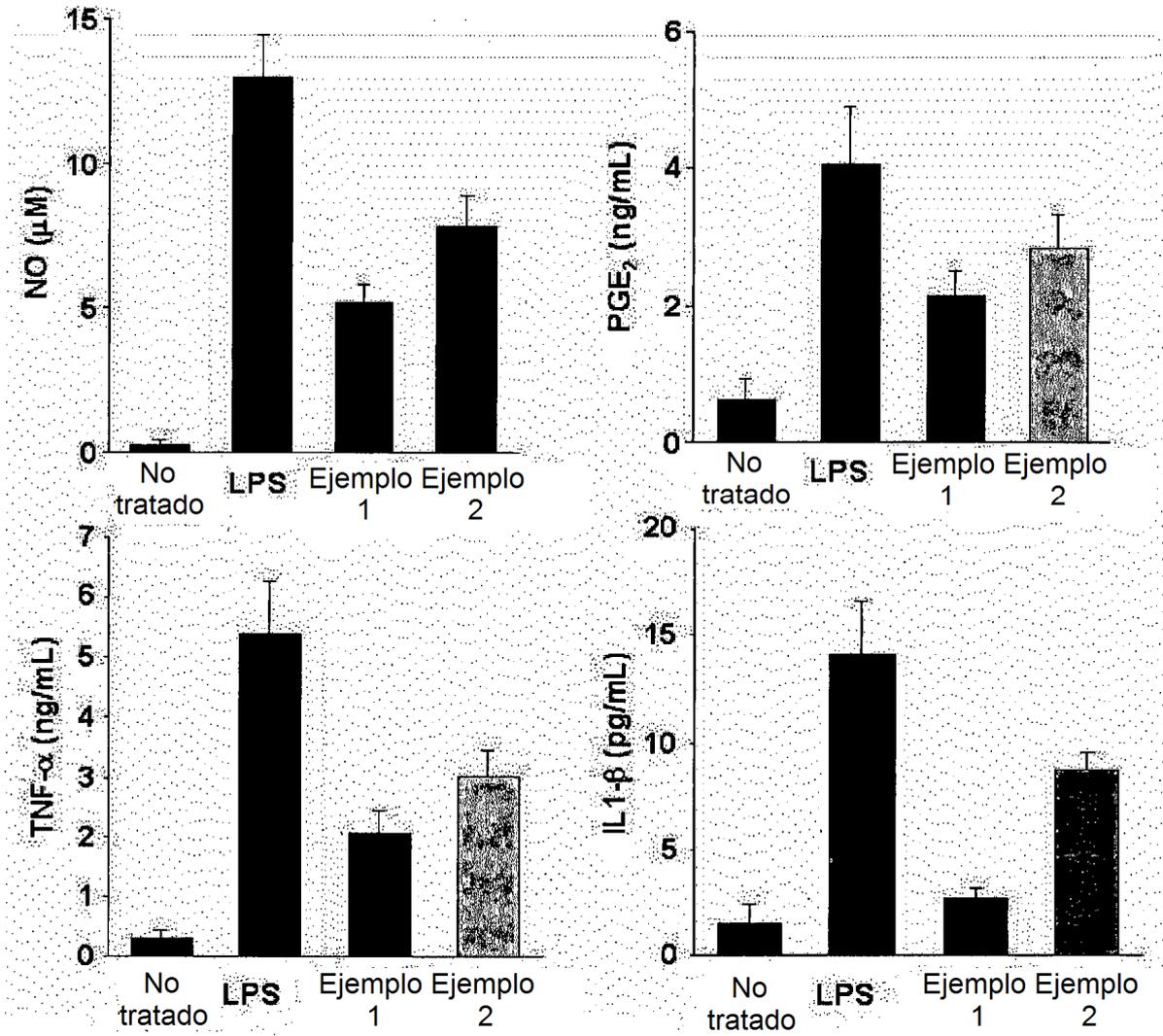


Figura 9

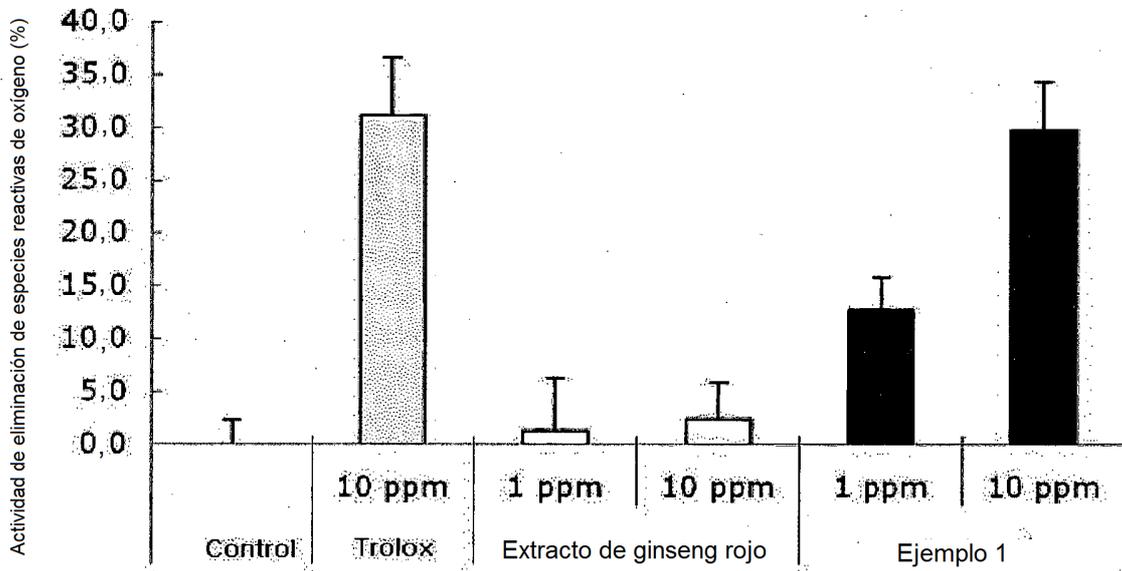


Figura 10

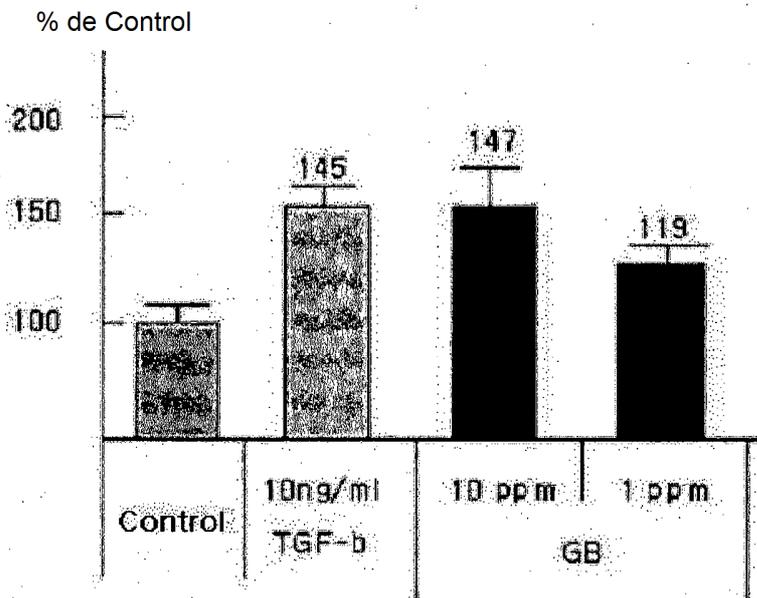


Figura 11

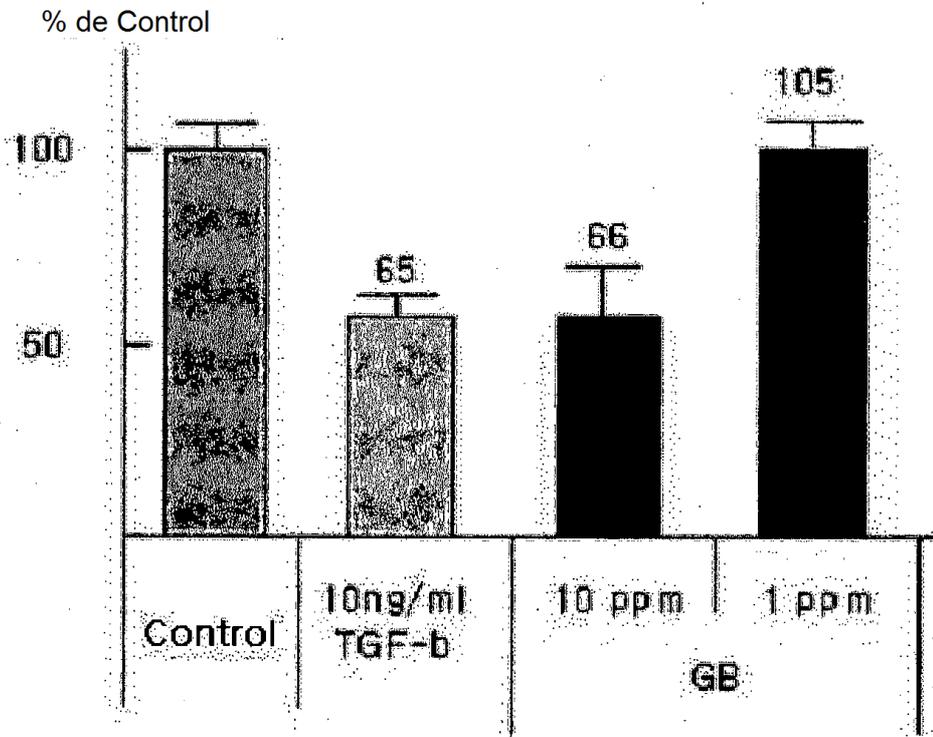


Figura 12

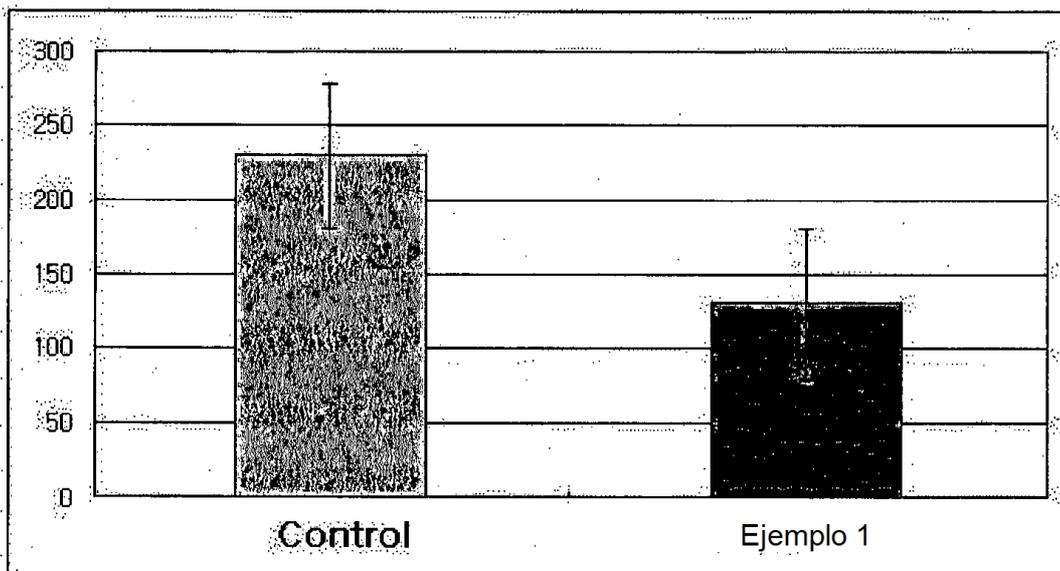


Figura 13

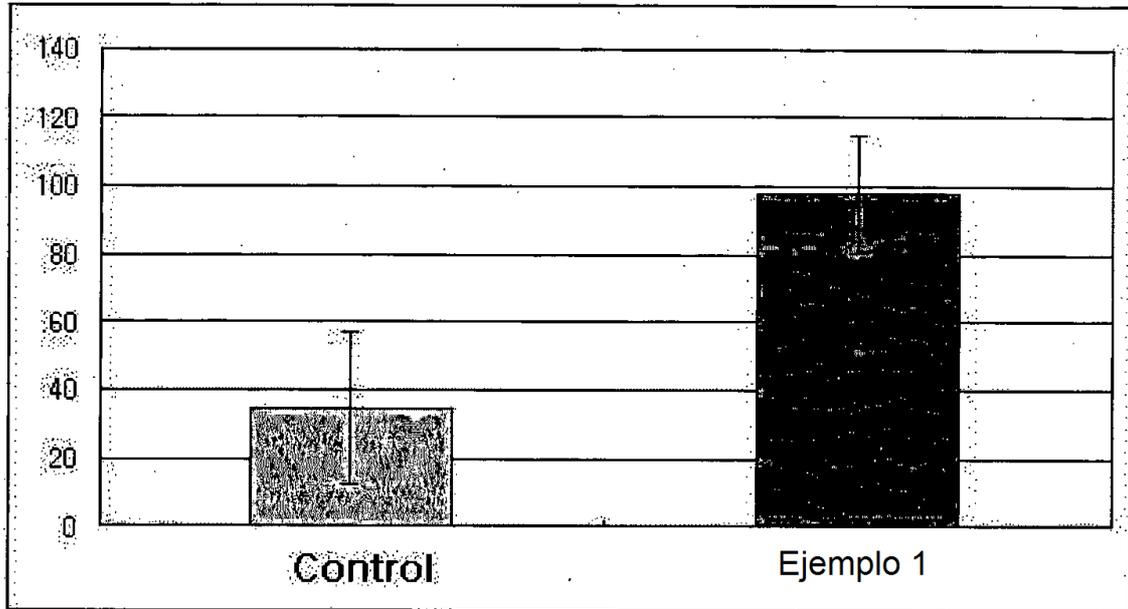


Figura 14

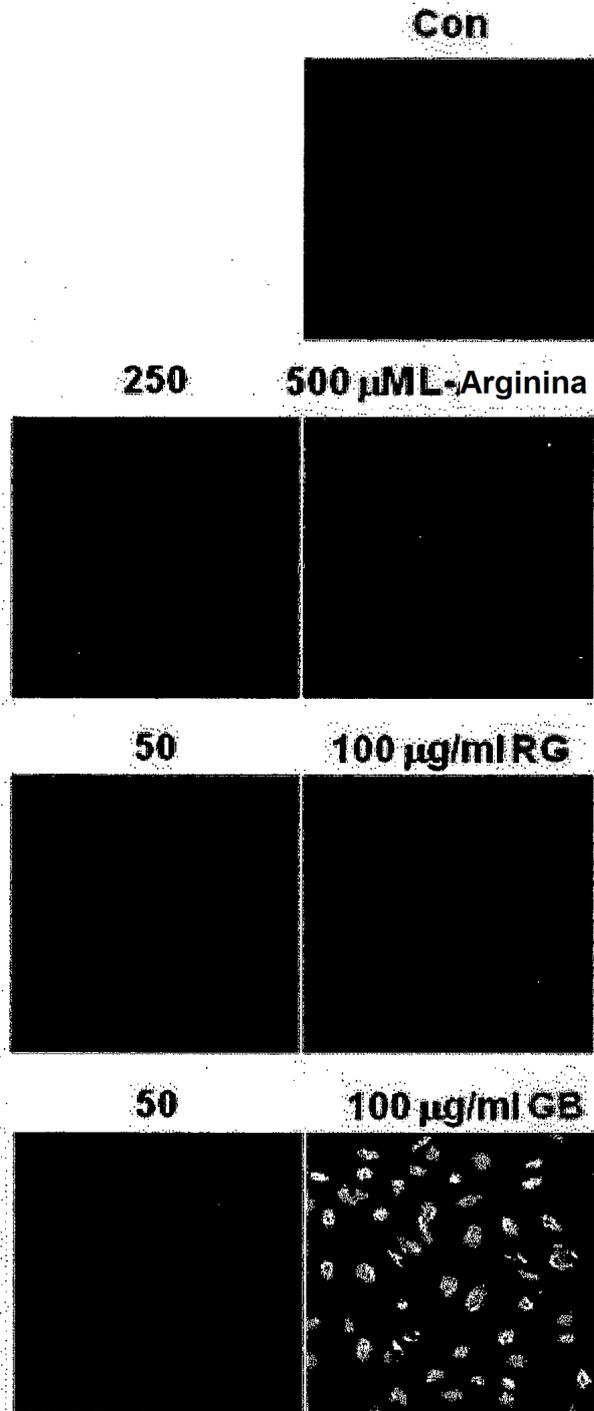


Figura 15

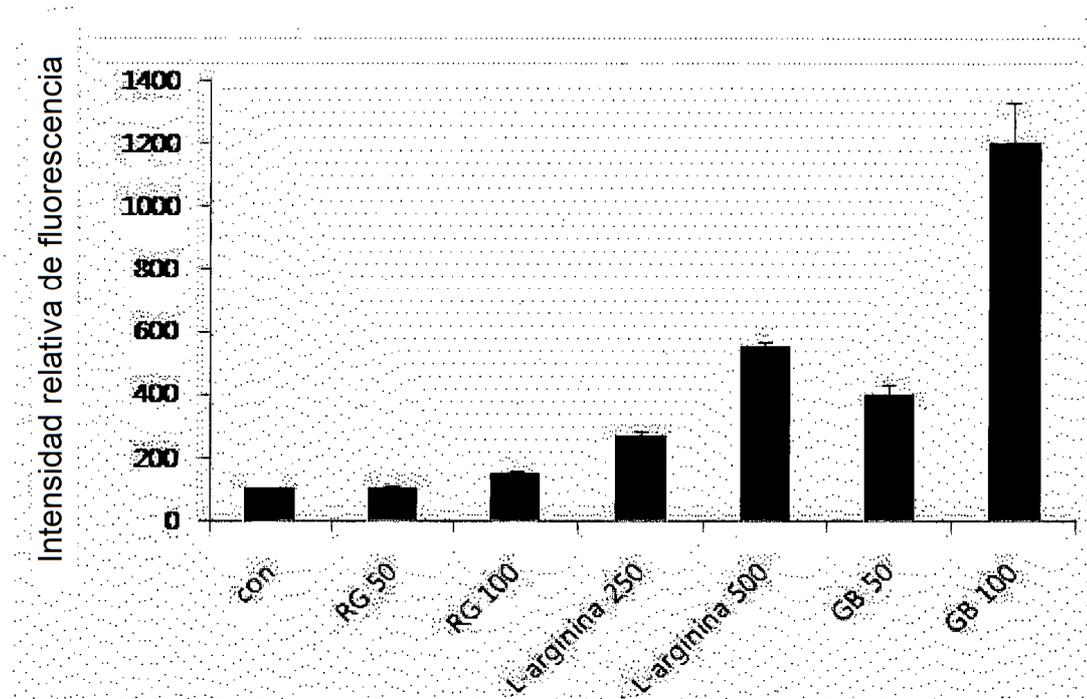


Figura 16

