

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 278**

51 Int. Cl.:

A61K 36/342 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 36/258 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2011 E 11780835 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2570132**

54 Título: **Procedimiento de preparación nuevo ginseng procesado o un extracto del mismo, cuyo contenido en ginsenósido normalmente mínimo está aumentado**

30 Prioridad:

14.05.2010 KR 20100045394

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.08.2015

73 Titular/es:

**GREEN CROSS HEALTH SCIENCE CO., LTD.
(100.0%)
813 Suntechcity 1-Cha, 513-15 Sangdaewon-
dong, Jungwon-gu, Sunnam-si
Gyeonggi-do 462-725, KR**

72 Inventor/es:

**YOO, YOUNG-HYO;
KIM, SUN-OK;
CHOI, JUNG HYO;
BAE, SOO-HYUN;
PARK, SUN KYU y
KIM, JEOM YONG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 543 278 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

Procedimiento de preparación nuevo ginseng procesado o un extracto del mismo, cuyo contenido en ginsenósido normalmente mínimo está aumentado

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación un nuevo ginseng procesado o extracto de ginseng procesado, que tiene contenidos aumentados de ginsenósido preparando saponinasa, fermentando el ginseng o el ginseng rojo con la saponinasa preparada e hidrolizando el ginseng o el ginseng rojo fermentado con un ácido orgánico y a una composición suplementaria anticancerosa que comprende el ginseng procesado o extracto de ginseng procesado preparado de este modo.

10 **Técnica anterior**

En la taxonomía vegetal, el ginseng es una planta perenne perteneciente al género Panax de la familia Araliaceae, y hasta ahora se conocen aproximadamente 11 especies de ginseng. Entre ellas, normalmente se sabe que Panax Ginseng C.A. Meyer tiene efectos medicinales excelentes. El término "ginseng" se usa en el sentido más amplio para incluir todo el ginseng fresco, ginseng blanco, ginseng rojo, ginseng de montaña salvaje, ginseng cultivado en bosques, ginseng de cola, ginseng cultivado y similares. El ginseng es un material natural que se ha usado como fármaco de alto valor medicinal en la medicina china y los efectos medicinales del ginseng se encuentran en muchos libros de medicina. Aunque el ginseng se ha utilizado durante un largo período de tiempo, la explicación científica de los efectos del ginseng mediante estudios clínicos es todavía insuficiente. Sin embargo, incluso después de que se introdujo la medicina moderna, el ginseng no perdió su popularidad y ocupa el primer lugar entre los alimentos funcionales de salud. Se piensa que esto se debe a que el ginseng es un fármaco crudo que exhibe efectos medicinales clínicamente probados, tiene menos efectos secundarios y es muy seguro. Los principales componentes funcionales del ginseng son las saponinas del ginseng, que se distinguen de las saponinas de otras plantas y se denominan ginsenósidos. Las saponinas del ginseng tienen efectos farmacológicos, incluyendo efectos anticancerosos, antialérgicos, antiinflamatorios, de inhibición nerviosa central, de relajación, de alivio del dolor, de mejora de la memoria, de recuperación de lesiones hepáticas, de estimulación de la síntesis de proteínas y lípidos, antidiabéticos, antiestrés, de estimulación de la promoción de sustancias antioxidantes, de regulación inmunitaria, de inhibición de la agregación plaquetaria y antienvjecimiento.

Las saponinas se clasifican en diversos ginsenósidos de acuerdo con el tipo y el número de azúcares (glucosa, arabinosa y ramnosa y) unidos a un sustituyente. Estas saponinas apenas se degradan por acción de las enzimas digestivas *in vivo* después de la ingesta oral (Hasegawa, H. et al., Microbial Ecology in Health and Disease, 12, 85-91, 2000) y son absorbidas después de la degradación en 20(S)-O- β -protopanaxadiol 20-O- β -D-glucopiranosido, 20(S)-protopanaxadiol y 20(S)-protopanaxatriol por los microorganismos intestinales (Hasegawa, H. et al., Planta Medica, 62, 453-457, 1996). Sin embargo, la absorción de las saponinas difiere entre los individuos, ya que los microorganismos intestinales difieren significativamente de un individuo a otro.

35 Mientras tanto, entre los principales componentes del ginseng, se sabe que las saponinas tales como ginsenósidos Rb1, Rb2 y Rc presentan los efectos farmacológicos del ginseng. Sin embargo, se sabe que los componentes del ginseng, que están implicados sustancialmente en los efectos contra el cáncer, la inhibición de la metástasis de células de cáncer, o efectos antialérgicos son el compuesto K (comp. K) y las saponinas de los ginsenósidos Rb1, Rb2 y R3, que están contenidos en cantidades muy pequeñas en el ginseng. El ginsenósido Rh2 y el compuesto K, que comprenden una molécula de glucosa unida a un sustituyente, tienen excelentes efectos anticancerosos, antialérgicos y antiinflamatorios y, al mismo tiempo, muestran elevadas tasas de adsorción y absorción intestinal, dado que el número de cadenas de azúcar unidas en ellos no es grande, por lo que tienen una hidrofiliidad baja. Por tanto, con el fin de usar los efectos anticancerosos, antialérgicos y potenciadores inmunológicos del ginseng, es preferible aumentar los contenidos del compuesto K y los ginsenósidos Rh2, Rh1 y Rg3, que no están contenidos o están contenidos en cantidades muy pequeñas en el ginseng.

De acuerdo con lo anterior, en los últimos años, con el fin de incrementar los contenidos y facilitar la absorción *in vivo* de los ingredientes activos del ginseng (ginsenósidos) que no están contenidos o están contenidos en cantidades muy pequeñas, se han intentado varios procedimientos, incluido un procedimiento de fermentar el ginseng usando microorganismos, un procedimiento de tratar el ginseng con enzimas y un procedimiento de hidrolizar el ginseng con ácido. Por ejemplo, la solicitud de patente coreana n° 2000-58997 divulga un procedimiento de fabricar ginseng absorbible sacarificado con ácido usando ácido sulfúrico o ácido clorhídrico, y la publicación de patente coreana abierta a consulta por el público n° 2003-87250 divulga un procedimiento de fabricar ginseng procesado que tiene contenidos aumentados de los ingredientes activos del ginseng y que contiene ginsenósidos específicos del ginseng rojo usando presión ultraalta. Adicionalmente, la publicación de patente coreana abierta a consulta por el público n° 2006-1834 divulga un procedimiento de preparar ginseng fermentado o ginseng rojo fermentado, que comprende una etapa de inocular ginseng o ginseng rojo con bacterias de ácido láctico Kimchi y de tratar el ginseng inoculado o el ginseng rojo con ácido, y la publicación de patente coreana abierta a consulta por el público n° 2003-61756 divulga un procedimiento de preparar una solución de ginseng fermentado que tiene propiedades funcionales y sensoriales excelentes, comprendiendo el procedimiento fermentar el ginseng con *Aspergillus* y degradar el ginseng fermentado con amilasa y proteasa. Además, la publicación de patente coreana

abierta a consulta por el público nº 2006-74970 divulga un ginseng fermentado que comprende una sustancia obtenida degradando glicósidos en el ginseng con la cepa Hasegawa de *Lactobacillus casei*, y la publicación de patente coreana abierta a consulta por el público nº 1998-40224 divulga un ginseng fermentado que comprende productos de saponina degradados obtenidos fermentando el ginseng con varias cepas de *Lactobacillus*.

5 Descripción detallada de la invención

Problema técnico

Como se ha descrito anteriormente, con el fin de incrementar los contenidos y facilitar la absorción in vivo de los ginsenósidos del ginseng que no están contenidos o están contenidos en cantidades muy pequeñas, se han intentado varios procedimientos, incluido un procedimiento de fermentar el ginseng usando microorganismos, un procedimiento de tratar el ginseng con enzimas y un procedimiento de hidrolizar el ginseng con ácido. Sin embargo, todavía no se ha desarrollado ni producido un producto de ginseng de alto valor añadido. Específicamente, al producir grandes cantidades de productos de ginseng utilizando alta energía con el fin de mejorar los componentes específicos, existen problemas asociados con la eficiencia, y al fermentar el ginseng con varios microorganismos, hay un problema en cuanto a que el contenido de los ingredientes activos estándar no puede controlarse a niveles constantes.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención cambiar la composición de ginsenósido del ginseng.

Otro objeto de la presente invención es aumentar el contenido de Rg3 y Rh2 entre los ginsenósidos del ginseng.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un procedimiento para extraer eficazmente los ingredientes activos del ginseng.

20 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un extracto de ginseng que tenga contenidos elevados de ginsenósido, preferiblemente contenidos altos de Rg3 y Rh2, y una composición de suplemento contra el cáncer que comprenda el extracto de ginseng.

Solución técnico

25 Para lograr los objetos anteriores, de acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación un ginseng procesado o un extracto de ginseng procesado, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

30 (a) inocular una cepa de *Aspergillus niger* en un medio compuesto de ginseng y salvado de trigo; (b) cultivar la cepa de la etapa (a); (c) purificar el material cultivado de la etapa (b); (d) separar una enzima a partir del material purificado de la etapa (c); (e) añadir la enzima de la etapa (d) al ginseng o al ginseng rojo; (f) fermentar el ginseng o el ginseng rojo de la etapa (e); (g) separar el material fermentado de la etapa (f) para obtener un sobrenadante; (h) concentrar el sobrenadante de la etapa (g); (i) hacer reaccionar el concentrado de la etapa (h) con un ácido orgánico; y (j) neutralizar, filtrar, purificar, concentrar y secar el producto de reacción de la etapa (i).

35 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación un ginseng procesado o extracto de ginseng procesado que tenga contenidos de ginsenósido incrementados, preferentemente contenidos de Rg3 y Rh2 aumentados, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

40 (a) inocular una cepa de *Aspergillus niger* en un medio compuesto de ginseng y salvado de trigo; (b) cultivar la cepa de la etapa (a); (c) purificar el material cultivado de la etapa (b); (d) separar una enzima a partir del material purificado de la etapa (c); (e) añadir la enzima de la etapa (d) al ginseng o al ginseng rojo; (f) fermentar el ginseng o el ginseng rojo de la etapa (e); (g) separar el material fermentado de la etapa (f) para obtener un sobrenadante; (h) concentrar el sobrenadante de la etapa (g); (i) hacer reaccionar el concentrado de la etapa (h) con un ácido orgánico; y (j) neutralizar, filtrar, purificar, concentrar y secar el producto de reacción de la etapa (i).

45 Los orígenes del ginseng que se utiliza en el procedimiento de la invención para preparar el ginseng procesado o el extracto de ginseng procesado incluyen, aunque no están específicamente limitados a los mismos, Corea, EE.UU., Japón, Himalaya, Vietnam y China. En el caso del ginseng rojo, en la presente invención se puede usar una cola fina de ginseng y una raíz de ginseng rojo.

50 La forma del ginseng que se utiliza en la preparación del ginseng procesado o del extracto de ginseng procesado de acuerdo con la presente invención puede ser ginseng, ginseng rojo, ginseng rojo, polvo de extracto de ginseng o de ginseng rojo o un extracto de ginseng o ginseng rojo. El extracto puede prepararse mediante extracción en agua caliente, extracción en alcohol o una combinación de los mismos. El tamaño de partícula del polvo de extracto de ginseng o de ginseng rojo no está específicamente limitado y puede ser, por ejemplo, de malla de aproximadamente 30-150. El extracto se puede preparar mediante destilación al vacío o destilación de película fina.

Además, el ginseng que se utiliza en la presente invención se puede seleccionar de entre raíces, hojas y tallos del

ginseng, y el ginseng rojo que se utiliza en la presente invención se puede seleccionar de entre colas finas de ginseng rojo y raíces de ginseng rojo.

A continuación, la presente invención se describirá con mayor detalle.

5 La cepa que se utiliza en la etapa (a) del procedimiento de preparación de la presente invención es *Aspergillus niger* (ACTC6985) obtenida del Centro de Recursos Biológicos. El medio en la etapa (a) comprende polvo de ginseng y salvado de trigo, que se mantiene a una relación en peso (g / g) de 1: 1-1: 5, preferiblemente 1: 3, y se inocula con *Aspergillus niger*. La inoculación del medio con *Aspergillus niger* se realiza de tal manera que el número de esporas en una suspensión de esporas de *Aspergillus niger* es 5×10^5 esporas por g del medio y el contenido inicial de agua se mantiene en un 50-80 %, preferiblemente 65 %.

10 En la etapa (b), la temperatura de cultivo se mantiene a 25~40 °C, preferiblemente 30 °C, y cuando la cepa se cultiva durante 3-7 días, la producción de saponinasa (enzima que degrada la saponina) alcanza el nivel más alto.

15 En las etapas (c) y (d), se añade solución tampón de acetato sódico 0,02 M al medio después de la finalización de la cepa, después de lo cual el medio se filtró a través de un filtro de microfibra de vidrio Watman y después se filtró más a través de un filtro 0,22 µm en la parte superior de la botella que contiene una enzima con el fin de eliminar completamente las esporas. El filtrado recogido se pasa a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un peso molecular de corte de 100 kDa para obtener una solución de enzima purificada. El ginseng o el ginseng rojo pueden fermentarse con la solución de saponinasa purificada concentrada obtenida como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, se puede añadir alcohol a la solución de enzima purificada para separar la saponinasa. Específicamente, se puede añadir alcohol a la solución de saponinasa purificada para precipitar la proteína, obteniendo de esta manera saponinasa como una masa, o la solución de saponinasa se puede liofilizar para obtener un polvo de saponinasa.

20 En las etapas (e) y (f), la saponinasa se añade al polvo de ginseng o de ginseng rojo o a un extracto de ginseng o de ginseng rojo o a un concentrado en polvo en una cantidad de 5-20 % del peso del polvo de ginseng o de ginseng rojo o del extracto de ginseng o de ginseng rojo o del concentrado en polvo y después se cultiva a una temperatura de fermentación adecuado de 25 ~ 60 °C, preferiblemente a 30~35 °C, durante 6-24 horas. Preferiblemente, se añaden 50 g de la enzima a una suspensión de 1 kg del extracto de ginseng de ginseng rojo en 30 l de agua

25 En la etapa (g), se añade alcohol al ginseng o ginseng rojo fermentado para precipitar la saponinasa, y el sobrenadante se separa mediante filtración (papel de filtro de 0,8 µm) o centrifugación, y el sobrenadante se recoge y se concentra a 50 °C.

30 En la etapa (i), se añade un ácido orgánico al ginseng o ginseng rojo fermentado y se hace reaccionar a 40~80 °C durante 2-18 horas. Los ejemplos del ácido orgánico que se utiliza en la etapa (i) incluyen, pero no se limitan específicamente a, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, y mezclas de los mismos. El ácido orgánico se añade a una solución al 10 % del concentrado de la etapa (h) en agua purificada en una cantidad de 1-50 % en peso, preferiblemente 5-25 % en peso, en base al peso de la solución de concentrado.

35 En las etapas (h) y (j) se puede usar agua o un agente neutralizante de ácido que es un aditivo alimentario para neutralizar el producto de la reacción con el ácido orgánico. La concentración del producto de la reacción con el ácido orgánico se puede realizar a 50 °C. La concentración del producto de reacción puede llevarse a cabo después de la adición de agua o alcohol al producto de reacción, filtrando la mezcla. Como alternativa, la concentración del producto de reacción puede llevarse a cabo después de la purificación del producto de la reacción de ácido orgánico con resina o una fracción de disolvente, tales como butanol o acetato de etilo, de acuerdo con un proceso de purificación general.

40 Además, cuando el ginseng procesado o extracto de ginseng procesado con un contenido incrementado de los ginsenósidos Rg3 y Rh2, preparado mediante el procedimiento de la presente invención, se utiliza en combinación con un agente anticanceroso que se ha utilizado clínicamente, exhibe un efecto sinérgico anticanceroso y proporciona una composición farmacéutica o agente de suplemento anticanceroso para prevenir y tratar la toxicidad en la médula ósea, células sanguíneas, el hígado o los riñones, que está producido por el agente anticanceroso. Ejemplos del agente anticanceroso incluyen cisplatino, carboplatino, paraplatino, oxaliplatino, nedaplatino, doxorubicina, taxol, tamoxifeno, camtobell, adrucil, glivec, etopósido, zometa, oncovin, lupron, gemzar, 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán y similares.

45 El ginseng procesado o extracto de ginseng procesado que tiene contenidos incrementados de los ginsenósidos Rg3 y Rh2, preparados mediante el procedimiento de la presente invención, se utiliza preferentemente en una cantidad de 0,1 a 1.000 partes en peso en base a 1 parte en peso del agente anticanceroso. Si el ginseng procesado o el extracto de ginseng procesado se utilizan en una cantidad en el intervalo anterior, se puede aumentar el efecto anticanceroso del agente anticanceroso y puede reducir de forma eficaz la toxicidad causada por el agente anticanceroso.

Efectos ventajosos

El uso del procedimiento de preparación de acuerdo con la presente invención puede proporcionar un ginseng

procesado o extracto de ginseng procesado que tiene contenidos de ginsenósido significativamente aumentados.

El uso del procedimiento de preparación de acuerdo con la presente invención puede proporcionar un ginseng procesado o extracto de ginseng procesado que tiene contenidos de ginsenósidos aumentados, en particular Rg3 y Rh2.

5 En la presente invención, los contenidos de los ginsenósidos Rg3 y Rh2 se compararon entre un ginseng fermentado solamente con saponinasa, un ginseng procesado sometido a un proceso de ácido orgánico y un ginseng procesado preparado mediante el procedimiento de la presente invención. Como resultado, se pudo apreciar que los contenidos de los ginsenósidos Rg3 y Rh2 fueron significativamente más altos en el ginseng procesado, sometido tanto al proceso de saponinasa como al proceso de ácido orgánico, que en el ginseng procesado sometido solo al proceso de saponinasa o al proceso de ácido orgánico (Tabla 1).

10 Mientras tanto, la saponinasa es una enzima obtenida mediante cultivo de *Aspergillus niger* en un medio que comprende ginseng y salvado de trigo, y esta tecnología ya se ha descrito en, por ejemplo, la publicación de patente coreana abierta a consulta por el público nº 10-1999-45180 relativa a un procedimiento de preparación de una saponina de ginseng cambiando la cadena de azúcar de la saponina de ginseng con una enzima. Además, se sabe que el moho tiene altas actividades de β -glucosidasa, α -arabinosidasa y α -ramnosidasa y secreta enzimas tales como proteasa y celulosa, que son útiles en la fermentación del ginseng o el ginseng rojo. Sin embargo, las tecnologías anteriores tienen un defecto en cuanto a que cuando se fermenta el ginseng o el ginseng rojo, los componentes ginsenósidos no cambian de forma constante, de manera que no se producen constantemente los componentes ginsenósidos fermentados.

15 20 En la presente invención, se encontró que una enzima obtenida mediante ultrafiltración después del cultivo de *Aspergillus niger* tiene β -glucosidasa y α -ramnosidasa. Asimismo, se encontró que la enzima obtenida se compone de β -glucosidasa y α -ramnosidasa mezcladas en una relación en peso (g / g) de 3: 1 a 8: 1 y tiene una actividad enzimática que es al menos dos veces mayor que la de antes de la ultrafiltración. Las actividades de la enzima de 1 que pasó a través de una membrana de ultrafiltración y la enzima 2 que no pasó a través de una membrana de ultrafiltración se analizaron mediante TLC. Como resultado, se confirmó que la enzima que pasó a través de la membrana de ultrafiltración produjo F2, que se convirtió en Rh2 mediante la reacción con un ácido orgánico, pero la enzima que no pasó a través de la membrana de ultrafiltración produjo una mayor cantidad de compuesto K (Com. K) de modo que la cantidad de F2 convertido en Rh2 fue pequeña (Fig. 4). La presente invención se ha realizado en base a este hallazgo. Específicamente, en la presente invención, la actividad de una enzima se incrementa mediante un procedimiento de purificación de una enzima capaz de expresar un alto nivel de ginsenósido Rh2 a partir de una enzima mezclada expresada en *Aspergillus niger* y un ginseng procesado estandarizado o extracto de ginseng procesado que tiene contenidos incrementados de los componentes ginsenósidos pueden producirse usando saponinasas que tienen una relación constante entre la β -glucosidasa y la α -ramnosidasa. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación estandarizada que puede aumentar el contenido de los ginsenósidos Rg3 y Rh2 y puede preparar un ginseng procesado o extracto de ginseng procesado que contenga cantidades constantes de Rg3 y Rh2. Por lo tanto, la presente invención puede preparar un ginseng o ginseng rojo procesado que tiene contenidos incrementados de de Rg3 y Rh2 al tiempo que se resuelve el problema de la técnica anterior en cuanto a que no se pudo predecir la relación del cambio en los contenidos de ginsenósido durante la fermentación.

25 30 35 40 Además, cuando se utiliza cada saponinasa purificada, hay un problema en cuanto a que se requieren grandes cantidades de tiempo y costes para la purificación de la enzima. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, la producción de saponinasas que tienen una relación constante es posible y el proceso de purificación de las saponinasas es simple y conveniente, y, por lo tanto, la producción en masa es fácil y el rendimiento de la purificación es alto de modo que se pueden reducir los costes de producción. Por otra parte, cuando la fermentación se lleva a cabo utilizando una mezcla de varios microorganismos, hay un problema de contaminación cruzada con otros microorganismos. Sin embargo, la contaminación cruzada se puede prevenir usando el moho único *Aspergillus niger*.

45 50 Además, de acuerdo con la presente invención, se producen saponinasas con el fin de fermentar ginseng o ginseng rojo. Utilizando el saponinasas producidas, el ginseng o el ginseng rojo se fermenta y después se añade un ácido orgánico para hidrolizar el ginseng o ginseng rojo fermentado. Como la técnica anterior relacionada, la solicitud de patente coreana Nº 10-2005-94311 divulga un procedimiento de preparación de un ginseng o ginseng rojo fermentado usando bacterias de ácido láctico Kimchi. De acuerdo con este procedimiento anterior, el ginseng o ginseng rojo se fermenta con bacterias de ácido láctico Kimchi y se tratan con bacterias de ácido láctico Kimchi, de modo que se prepara un ginseng o ginseng rojo fermentado. Sin embargo, se pudo apreciar que el ginseng o ginseng rojo fermentado preparado de acuerdo con esta técnica anterior contiene poco o nada de Rh2 y contiene una pequeña cantidad de Rg3 (FIGS. 5 y 6).

55 Con el fin de resolver estos problemas, en la presente invención, las saponinasas purificadas mediante ultrafiltración se usan para fermentar ginseng o ginseng rojo, y se añade un ácido orgánico, preparando de este modo un ginseng o ginseng rojo procesado que tiene contenidos incrementados de de Rg3 y Rh2.

60 Preferiblemente, en un ginseng procesado o extracto de ginseng procesado de acuerdo con la presente invención,

los contenidos de los ginsenósidos Rg3 y Rh2 son 0,05-1 %, y en un extracto de ginseng procesado preparado usando un concentrado de ginseng o un concentrado de ginseng rojo, los contenidos de los ginsenósidos Rg3 y Rh2 son 0,5-5 %. Además, en un extracto de ginseng procesado preparado usando polvo concentrado de ginseng o polvo concentrado de ginseng rojo, los contenidos de los ginsenósidos Rg3 y Rh2 son 0,5-30 %, y en un extracto de ginseng procesado preparado mediante la purificación de las saponinas de ginseng o las saponinas de ginseng rojo, los contenidos de los ginsenósidos Rg3 y Rh2 son 30-50 %.

Además, cuando el ginseng procesado o extracto de ginseng procesado con un contenido incrementado de Rg3 y Rh2, preparado mediante el procedimiento de la presente invención, se utiliza en combinación con un agente anticanceroso que se ha utilizado clínicamente, exhibe un efecto sinérgico anticanceroso y previene la toxicidad en la médula ósea, las células sanguíneas, el hígado o los riñones, que está producida por el agente anticanceroso.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es un espectro que muestra el cambio en los componentes de saponina de un extracto de ginseng como una función de un reactante enzimático y un reactante de ácido orgánico.

La FIG. 2 es un espectro que muestra que Rg1 se produce cuando el Re estándar se hace reaccionar con la enzima de la presente invención, produciendo de ese modo α -ramnosidasa.

La FIG. 3 es un espectro que muestra que Rh2 se produce cuando el Rg3 estándar se hace reaccionar con la enzima de la presente invención, produciendo de ese modo β -glucosidasa.

La FIG. 4 es un cromatograma en capa fina (TLC) que muestra las actividades de la enzima de 2 que ha pasado a través de una membrana de ultrafiltración en las etapas (c) y (d) de la presente invención y la enzima 1 que no ha pasado a través de una membrana de ultrafiltración, y FIG. 4 muestra que la enzima que ha pasado a través de la membrana de ultrafiltración produjo F2 que se convirtió en Rh2 mediante la reacción con un ácido orgánico, pero la enzima que no ha pasado a través de la membrana de ultrafiltración produjo una mayor cantidad de compuesto K (Com. K) de modo que la cantidad de F2 convertido en Rh2 era pequeña.

La FIG. 5 es un espectro que muestra una comparación de la producción de Rg3 entre la presente invención y la técnica anterior.

La FIG. 6 es un espectro que muestra una comparación de la producción de Rh2 entre la presente invención y la técnica anterior.

Modos para llevar a cabo la invención

En lo que sigue en el presente documento, la presente invención se describirá con mayor detalle con referencia a los ejemplos. No obstante, cabe entender que estos ejemplos son para fines ilustrativos y no están concebidos para limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de ginseng procesado utilizando ginseng

250 g de polvo de ginseng y 750 g de salvado de trigo se mezclaron entre sí y se esterilizaron en un esterilizador de vapor de alta presión a 121 °C y a 1,5 atm. Se añadieron 2 l de agua esterilizada al medio esterilizado, después, se cultivó una suspensión de *Aspergillus niger* (5×10^5 esporas / g de medio) en el medio a 28 °C durante 7 días. Una vez terminado el cultivo, se añadió una solución tampón de acetato sódico 0,02 M y se mezcló con el cultivo y se filtró el medio. El cultivo filtrado se filtró utilizando una membrana de ultrafiltración (de 100 kDa o más) y se concentró, obteniendo de esta manera 60 g de una solución de enzima. Se añadieron 30 g de la solución de enzima a 200 g de ginseng, que después se cultivó a 28 °C durante 18 horas, después de lo cual se añadió alcohol para precipitar la enzima, y el sobrenadante se concentró. Se añadieron 2 l de agua purificada a 200 g del concentrado y a ello se añadieron 250 g de ácido cítrico, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 18 horas. Una vez completada la reacción, se añadió 70 % de alcohol, seguido de filtración y concentración, obteniéndose de este modo 200 g de ginseng procesado.

Ejemplo 2: Preparación de concentrado de ginseng procesado utilizando concentrado de ginseng

250 g de polvo de ginseng y 750 g de salvado de trigo se mezclaron entre sí y se esterilizaron en un esterilizador de vapor de alta presión a 121 °C y a 1,5 atm. Se añadieron 2 l de agua esterilizada al medio esterilizado, después, y después se inoculó una suspensión de *Aspergillus niger* (5×10^5 esporas / g de medio) en el medio y se cultivó a 28 °C durante 7 días. Una vez terminado el cultivo, se añadió una solución tampón de acetato sódico 0,02 M y se mezcló con el cultivo y se filtró el medio. El cultivo filtrado se filtró utilizando una membrana de ultrafiltración (de 100 kDa o más) y se concentró, obteniendo de esta manera 60 g de una solución de enzima. Se añadieron 30 g de la solución de enzima a 200 g de un concentrado de ginseng, que después se cultivó a 28 °C durante 18 horas, después de lo cual se añadió alcohol para precipitar la enzima, y el sobrenadante se concentró. Se añadieron 2 l de agua purificada a 200 g del concentrado y a ello se añadieron 250 g de ácido cítrico, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 18 horas. Una vez completada la reacción, se añadió 70 % de alcohol, seguido de filtración y concentración,

obteniéndose de este modo 190 g de un concentrado de ginseng procesado.

Ejemplo 3: Preparación de polvo de concentrado de ginseng procesado utilizando polvo de concentrado de ginseng

5 250 g de polvo de ginseng y 750 g de salvado de trigo se mezclaron entre sí y se esterizaron en un esterilizador de vapor de alta presión a 121 °C y a 1,5 atm. Se añadieron 2 l de agua esterilizada al medio esterilizado, después, y después se inoculó una suspensión de *Aspergillus niger* (5×10^5 esporas / g de medio) en el medio y se cultivó a 28 °C durante 7 días. Una vez terminado el cultivo, se añadió una solución tampón de acetato sódico 0,02 M y se mezcló con el cultivo y se filtró el medio. El cultivo filtrado se filtró utilizando una membrana de ultrafiltración (de 100 kDa o más) y se concentró, obteniendo de esta manera 60 g de una solución de enzima. Se añadieron 30 g de la solución de enzima a 200 g de polvo de concentrado de ginseng, que después se cultivó a 28 °C durante 18 horas, después de lo cual se añadió alcohol para precipitar la enzima, y el sobrenadante se concentró. Se añadieron 2 l de agua purificada a 200 g del concentrado y a ello se añadieron 250 g de ácido acético, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 8 horas. Una vez completada la reacción, se añadió 70 % de alcohol, seguido de filtración, concentración y secado, obteniéndose de este modo 195 g de polvo de concentrado de ginseng procesado.

15 **Ejemplo 4: Preparación de ginseng rojo procesado utilizando ginseng rojo**

250 g de polvo de ginseng y 750 g de salvado de trigo se mezclaron entre sí y se esterizaron en un esterilizador de vapor de alta presión a 121 °C y a 1,5 atm. Se añadieron 2 l de agua esterilizada al medio esterilizado, después, se cultivó una suspensión de *Aspergillus niger* (5×10^5 esporas / g de medio) en el medio a 28 °C durante 7 días. Una vez terminado el cultivo, se añadió una solución tampón de acetato sódico 0,02 M y se mezcló con el cultivo y se filtró el medio. El cultivo filtrado se filtró utilizando una membrana de ultrafiltración (de 100 kDa o más) y se concentró, obteniendo de esta manera 60 g de una solución de enzima. Se añadieron 30 g de la solución de enzima a 200 g de ginseng rojo, que después se cultivó a 28 °C durante 18 horas, después de lo cual se añadió alcohol para precipitar la enzima, y el sobrenadante se concentró. Se añadieron 2 l de agua purificada a 200 g del concentrado y a ello se añadieron 250 g de ácido acético, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 18 horas. Una vez completada la reacción, se añadió 70 % de alcohol, seguido de filtración, concentración y secado, obteniéndose de este modo 200 g de ginseng rojo procesado.

Ejemplo 5: Preparación de concentrado de ginseng rojo procesado utilizando concentrado de ginseng rojo

30 250 g de polvo de ginseng y 750 g de salvado de trigo se mezclaron entre sí y se esterizaron en un esterilizador de vapor de alta presión a 121 °C y a 1,5 atm. Se añadieron 2 l de agua esterilizada al medio esterilizado, después, y después se inoculó una suspensión de *Aspergillus niger* (5×10^5 esporas / g de medio) en el medio y se cultivó a 28 °C durante 7 días. Una vez terminado el cultivo, se añadió una solución tampón de acetato sódico 0,02 M y se mezcló con el cultivo y se filtró el medio. El cultivo filtrado se filtró utilizando una membrana de ultrafiltración (de 100 kDa o más) y se concentró, obteniendo de esta manera 60 g de una solución de enzima. Se añadieron 30 g de la solución de enzima a 200 g de un concentrado de ginseng rojo, que después se cultivó a 28 °C durante 18 horas, después de lo cual se añadió alcohol para precipitar la enzima, y el sobrenadante se concentró. Se añadieron 2 l de agua purificada a 200 g del concentrado y a ello se añadieron 250 g de ácido cítrico, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 18 horas. Una vez completada la reacción, se añadió 70 % de alcohol, seguido de filtración y concentración, obteniéndose de este modo 190 g de un concentrado de ginseng rojo procesado.

40 **Ejemplo 6: Preparación de concentrado de ginseng rojo procesado utilizando polvo de concentrado de ginseng rojo**

250 g de polvo de ginseng y 750 g de salvado de trigo se mezclaron entre sí y se esterizaron en un esterilizador de vapor de alta presión a 121 °C y a 1,5 atm. Se añadieron 2 l de agua esterilizada al medio esterilizado, después, y después se inoculó una suspensión de *Aspergillus niger* (5×10^5 esporas / g de medio) en el medio y se cultivó a 28 °C durante 7 días. Una vez terminado el cultivo, se añadió una solución tampón de acetato sódico 0,02 M y se mezcló con el cultivo y se filtró el medio. El cultivo filtrado se filtró utilizando una membrana de ultrafiltración (de 100 kDa o más) y se concentró, obteniendo de esta manera 60 g de una solución de enzima. Se añadieron 30 g de la solución de enzima a 200 g de polvo de concentrado de ginseng rojo, que después se cultivó a 28 °C durante 18 horas, después de lo cual se añadió alcohol para precipitar la enzima, y el sobrenadante se concentró. Se añadieron 2 l de agua purificada a 200 g del concentrado y a ello se añadieron 250 g de ácido acético, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 8 horas. Una vez completada la reacción, se añadió 70 % de alcohol, seguido de filtración, concentración y secado, obteniéndose de este modo 195 g de polvo de concentrado de ginseng rojo procesado.

Ejemplo 7: Preparación de extracto de ginseng procesado purificado utilizando polvo de concentrado de ginseng

55 250 g de polvo de ginseng y 750 g de salvado de trigo se mezclaron entre sí y se esterizaron en un esterilizador de vapor de alta presión a 121 °C y a 1,5 atm. Se añadieron 2 l de agua esterilizada al medio esterilizado, después, y después se inoculó una suspensión de *Aspergillus niger* (5×10^5 esporas / g de medio) en el medio y se cultivó a 28 °C durante 7 días. Una vez terminado el cultivo, se añadió una solución tampón de acetato sódico 0,02 M y se mezcló con el cultivo y se filtró el medio. El cultivo filtrado se filtró utilizando una membrana de ultrafiltración (de 100

5 kDa o más) y se concentró, obteniendo de esta manera 60 g de una solución de enzima. Se añadieron 30 g de la solución de enzima a 200 g de polvo de concentrado de ginseng, que después se cultivó a 28 °C durante 18 horas, después de lo cual se añadió alcohol para precipitar la enzima, y el sobrenadante se concentró. Se añadieron 2 l de agua purificada a 200 g del concentrado y a ello se añadieron 250 g de ácido acético, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 8 horas. Una vez completada la reacción, se añadió 70 % de alcohol, seguido de filtración, concentración y secado, obteniéndose de este modo 195 g de polvo de concentrado de ginseng procesado. El polvo de concentrado de ginseng procesado se purificó usando resina, obteniéndose de este modo 10 g de un extracto de ginseng procesado.

10 **Ejemplo comparativo 1: Preparación de polvo de concentrado de ginseng procesado fermentado solo con saponinasa**

El polvo de concentrado de ginseng procesado se obtuvo de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la reacción con el ácido orgánico (ácido acético) no se llevó a cabo.

15 **Ejemplo comparativo 2: Preparación de polvo concentrado de ginseng procesado que solo reaccionó con ácido orgánico**

El polvo de concentrado de ginseng procesado se obtuvo de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que el tratamiento con la enzima no se llevó a cabo. Específicamente, se añadieron 2 l de agua purificada a 200 g del polvo de concentrado de ginseng y a ello se añadieron 250 g de ácido acético, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 8 horas. Una vez completada la reacción, se añadió 70 % de alcohol, seguido de filtración, concentración y secado, obteniéndose de este modo 195 g de polvo de concentrado de ginseng procesado.

20 **Ejemplo comparativo 3: Preparación de polvo concentrado de ginseng procesado que solo reaccionó con saponinasa no purificada**

El polvo de concentrado de ginseng procesado se obtuvo mediante la reacción con la reacción orgánica de la misma manera que en el Ejemplo 3, excepto que se utilizó saponinasa no purificada mediante ultrafiltración.

25 Los cambios en los contenidos de saponina del ginseng procesado o el extracto de ginseng procesado de acuerdo con la presente invención se muestran en la Tabla 1 dada a continuación.

[Tabla 1]

Cambios en los contenidos de saponina del ginseng procesado o extracto de ginseng procesado		
	Contenido (%)	
	Rg3	Rh2
Ejemplo 1	0,2	0,3
Ejemplo 2	3	3
Ejemplo 3	12	18
Ejemplo 4	0,6	0,8
Ejemplo 5	1	3
Ejemplo 6	5	10
Ejemplo 7	20	29
Ejemplo comparativo 1	1	0,05
Ejemplo comparativo 2	5	-
Ejemplo comparativo 3	1	1
Ginseng	<0,01	<0,01
Concentrado de ginseng	<0,5	<0,01
Polvo de concentrado de ginseng	<0,5	<0,01
Ginseng rojo	<0,01	<0,01
Concentrado de ginseng rojo	<0,5	<0,01
Polvo de concentrado de ginseng rojo	<0,5	<0,01

Ejemplo de prueba 1: Análisis de saponinasa

A la solución tampón de acetato sódico 20 mM se añadió cada uno de 50 mg de la muestra de Rg3 estándar y 50

mg de la muestra de Re estándar y a ello se añadió la saponinasa de la presente invención. Después, cada una de las mezclas se agitó a una temperatura constante de 32 °C durante 22 horas. Cada uno de los productos de la reacción enzimática se separó en capas mediante la adición de butanol a la misma, y la capa de butanol se concentró y se analizó mediante HPLC. El análisis HPLC se realizó en las siguientes condiciones:

- 5 1) Instrumento: Shiseido nanospace SI-2
- 2) Columna: Capcell Pak C18 UG80 4,6 x 150 mm (5 µm)
- 3) Caudal: 1,00 ml/min
- 4) Longitud de onda UV: 203 nm
- 5) Temperatura de la columna: 40 °C
- 10 6) Cantidad de inyección: 20 µl
- 7) Fase móvil: ① Análisis de Re: 20 % de acetonitrilo

② Análisis de Rg3: gradiente de concentración con 40 % de acetonitrilo y 60 % de acetonitrilo durante 40 minutos.

15 A partir de los resultados de la prueba, se pudo apreciar que, cuando el Re estándar se hizo reaccionar con la enzima de la presente invención, se produjo Rg1, lo que sugiere que hay α-ramnosidasa presente en la saponinasa de la presente invención. Además, a partir de los resultados de la prueba se pudo apreciar que, cuando el Rg3 estándar se hizo reaccionar con la enzima de la presente invención, se produjo Rh2, lo que sugiere que hay beta-glucosidasa presente en la saponinasa de la presente invención (FIGS. 2 y 3).

Ejemplo de prueba 2: Análisis TLC de saponinasa

20 La saponinasa se cultivó y se pasó a través de una membrana de ultrafiltración para obtener la enzima 2. 25 mg de cada uno de enzima 1 y enzima 1 que no ha pasado a través de una membrana de ultrafiltración se hizo reaccionar con 50 mg de la Rb1 estándar y los productos de reacción se analizaron mediante TLC. En el análisis TLC, CHCl₃: MeOH: H₂O=7:2,5:0,5 se utilizó como una solución de desarrollo y la solución de ácido sulfúrico al 5 %-anisaldehído se utilizó como un reactivo de desarrollo de color (FIG. 4).

Ejemplo de prueba 3: Determinación de la relación de las saponinasas

25 La saponinasa de la presente invención se añadió lentamente a sulfato amónico en una cantidad de 50 % (p / v) a 4 °C mientras se agitaba bien la mezcla. La solución enzimática se centrifugó a 12000 x g durante 30 minutos y el precipitado se recogió, se disolvió en solución tampón de acetato sódico 0,01 M y se dializó en la misma solución tampón. La solución enzimática dializada se pasó a través de una columna de DEAE-celulosa de modo que se adsorbió sobre la columna y a ello se añadió 0,01 moles de cloruro potásico de manera que la enzima se separó en
30 fracciones. Entre las fracciones enzimáticas separadas, solo las fracciones que tienen actividad enzimática se confirmó que obtenían beta-glucosidasa y alfa-ramnosidasa relativamente purificadas y se determinó la relación entre la beta-glucosidasa y la alfa-ramnosidasa obtenidas (véase la Tabla 2).

[Tabla 2]

Proporción entre la beta-glucosidasa y la alfa-ramnosidasa relativamente purificadas			
	Rendimiento (% p)		Proporción en peso (beta-glucosidasa: alfa-ramnosidasa)
	beta-glucosidasa	alfa-ramnosidasa	
Primera	8,4	2,8	3,0:1
Segunda	25	3,2	7,8:1
Tercera	12	25	4,8:1

35 **Ejemplo de prueba 4: Ensayo de toxicidad aguda**

El concentrado de ginseng procesado obtenido en el Ejemplo se disolvió en agua purificada a concentraciones de 100, 300 y 500 mg / ml para obtener soluciones de muestra para la administración a ratones. Ratones ICR machos sanos y hembras sanos de 6 semanas de edad se dejaron en ayunas durante 5 horas antes de la administración de las soluciones de muestra y después se administraron 10 ml/kg de cada solución de muestra por vía oral a los
40 grupos de animales, cada uno consistente en 5 ratones macho y 5 ratones hembra, de modo que la dosis de la muestra fue 0,5 g/kg, 1 g/kg o 2 g/kg. Como control se administró la cantidad de la muestra de agua purificada. Durante el período de prueba, se permitió a los animales de prueba acceso a comida y agua *ad libitum*. Para todos

5 los animales de prueba, se observaron las condiciones clínicas de forma continua durante 30 minutos inmediatamente después de la administración de las soluciones de muestra y se observaron una vez al día durante el período de prueba, y los pesos corporales de los animales se midieron inmediatamente antes de la administración y 1, 3, 7 y 14 días después de la administración. La diferencia en el peso corporal entre el grupo control y los grupos de prueba se analizó usando la prueba t de Student.

10 Ninguno de los animales murió durante el periodo de prueba, lo que sugiere que la dosis letal al 50 % (DL₅₀) del extracto de ginseng procesado para los ratones blancos es superior a 2 g / kg. Asimismo, los grupos a los que se ha administrados la muestra no mostraron condiciones que se pensara que estuvieran producidas por la administración de la muestra, a diferencia del grupo control, y no mostraron una diferencia en el peso corporal con respecto al grupo control. Además, en la autopsia después del período de observación, no se observaron visualmente anomalías en los órganos. Tomando en conjunto los resultados anteriores, se puede concluir que el ginseng o ginseng rojo procesado de acuerdo con la presente invención es altamente seguro.

Ejemplo de prueba 5: Preparación y efecto de la composición de suplemento contra el cáncer

15 Como animales de prueba, ratones Balb/c-nu/nu hembras de 6 semanas de edad (peso: 20 ± 2 g) suministrados por Orient Co. Ltd. Se introdujeron en una cámara a una temperatura de 23 ± 1 °C a una humedad relativa de 55 ± 15 % con un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Los animales se aclimataron durante 1 semana, mientras se les permitió acceso a comida (Orient Co. Ltd.) *ad libitum*, y se observaron visualmente las condiciones en los animales. Después de la aclimatación de 1 semana, 100 µl de células HT-29 se trasplantaron por vía subcutánea en el flanco de los ratones Balb/c nu/nu a una concentración de 1 x 10⁷ células / ratón, seguido de observación visual.

20 Los ratones que tienen un tamaño de tumor de aproximadamente 200 mm³ se agruparon al azar y después se inició la administración de la muestra de fármaco. El peso y el volumen del tumor se midieron dos veces a la semana y la medición del volumen del tumor se realizó mediante la medición de la longitud y la anchura del tumor usando compás Vernier. El volumen del tumor se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$\text{Volumen del tumor (mm}^3\text{)} = l \times w^2 \times 0,5$$

25 en la que l= longitud y w= anchura.

Cada uno de los productos de ginseng preparados en los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos anteriores y varios concentrados relacionados con ginseng se diluyó en agua destilada (AD) a una concentración de 100 mg / kg de PC, y después se administró por vía oral a los ratones utilizando una sonda oral. La muestra de prueba se administró a una dosis de 200 µl a 20 g dependiendo del peso medido el día de administración y la administración de la muestra de ensayo se llevó a cabo a las 11 de la mañana una vez al día. En la administración FOLFOX, la muestra de ensayo se disolvió en 3 ml de una solución al 0,9 % de NaCl a una concentración de 5-fluorouracilo (5-FU) / leucovorina (LV) + Oxaliplatino (Ox) = 16: 5: 1 mg / kg de PC, y después se administró por vía intraabdominal una vez al día y cinco veces a la semana. La Tabla 3 dada a continuación muestra los procedimientos de administración y las dosis en el FOLFOX y los Ejemplos Comparativos.

35 [Tabla 3]

Procedimientos de administración y dosis en FOLFOX y los ejemplos comparativos		
Grupo de prueba	Procedimientos de administración	
Control (solo las células HT-29)	Administración abdominal/0,9 % de NaCl	AD/administración oral
FOLFOX (16:5:1 mg/kg/PC)	Administración abdominal de FOLFOX (primeros 5 días)	AD/administración oral
FOLFOX + Ejemplo 2 (100 mg/kg PC)		Administración oral (todos los días) de los extractos de los ejemplos
FOLFOX + Ejemplo 3 (100 mg/kg PC)		
FOLFOX + Ejemplo 6 (100 mg/kg PC)		
FOLFOX + Ejemplo comparativo 2 (100 mg/kg PC)		
FOLFOX + concentrado de ginseng (100 mg/kg PC)		
FOLFOX + polvo de concentrado de ginseng (100 mg/kg PC)		
FOLFOX + polvo de concentrado de ginseng rojo (100 mg/kg PC)		

Antes del sacrificio de los ratones, se recogió sangre del plexo venoso usando un capilar heparinizado (Chase

instrumentos Co.) y se introdujo en un tubo de ensayo (Sherwood Medical Co.) que contiene EDTA (K3) y se mezcló usando un mezclador de rodillo. Después se midieron los niveles de glóbulos blancos, glóbulos rojos, PLT (plaquetas) en la muestra de sangre usando un contador Coulter. El contador Coulter se utilizó en el análisis de sangre después de corregir los valores de glóbulos blancos, glóbulos rojos y PLT con una solución 4C plus de acuerdo con una solución estándar. Asimismo, la sangre obtenida del corazón se centrifugó inmediatamente a 3.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos para obtener el suero. Usando el suero obtenido se cuantificaron los valores de AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa), nitrógeno ureico en sangre y creatinina en las 24 horas posteriores a la recogida del suero. La Tabla 4 dada a continuación muestra el efecto sinérgico anticanceroso del extracto de ginseng procesado de la presente invención cuando se utiliza en combinación con FOLFOX en ratones Balb / C atímicos trasplantados con células de cáncer colorrectal HT-29. Como puede verse en la Tabla 4, cuando se administraron FOLFOX y el extracto de ginseng procesado de la presente invención a los ratones Balb / C atímicos trasplantados con células de cáncer colorrectal HT-29 apareció un efecto sinérgico anticanceroso. Con respecto al tratamiento con FOLFOX (5-FU / LV + Ox = 16: 5: 1 mg / kg de peso corporal), cuando el volumen del tumor alcanzó 200 mm³ después del trasplante de las células, los ratones se agruparon aleatoriamente y se administró FOLFOX por vía intraabdominal a los ratones de forma continua durante los primeros 5 días. El fármaco se administró por vía oral cada día a una concentración de 100 mg / kg de PC. Después de la administración durante 4 semanas, el grupo FOLFOX mostró una proporción de inhibición del crecimiento del cáncer de 42,7 % en comparación con el grupo control. Por otro lado, la administración del Ejemplo 2 en combinación con FOLFOX mostró una proporción de inhibición del crecimiento del cáncer de 74,6 %, y la administración del Ejemplo 3 en combinación con FOLFOX mostró una proporción de inhibición del crecimiento del cáncer de 80,2 %, y la administración del Ejemplo 6 en combinación con FOLFOX mostraron una relación de inhibición del crecimiento del cáncer de 77 %. Por lo tanto, los extractos de ginseng de los ejemplos de la presente invención mostraron efectos anticancerosos significativamente excelentes en comparación con el concentrado de ginseng convencional, el polvo de concentrado de ginseng o el polvo del concentrado de ginseng rojo y el Ejemplo Comparativo 2 (inhibición de 58,7 %).

[Tabla 4]

Efecto anticanceroso sinérgico en el uso de FOLFOX en combinación con el extracto de ginseng procesado de la presente invención		
Grupos de prueba (n = 5)	Volumen tumoral (mm ³)	Proporción de inhibición (%)
Control (solo las células HT-29)	1960,4 ± 98,69	0
FOLFOX (16:5:1 mg/kg/PC)	1123,2 ± 75,19	42,7
FOLFOX + Ejemplo 2 (100 mg/kg PC)	501 ± 27,21*	74,6
FOLFOX + Ejemplo 3 (100 mg/kg PC)	387,2 ± 21,57*	80,2
FOLFOX + Ejemplo 6 (100 mg/kg PC)	450,2 ± 13,8*	77,0
FOLFOX + Ejemplo comparativo 2 (100 mg/kg PC)	809,2 ± 14,22	58,7
FOLFOX + concentrado de ginseng (100 mg/kg PC)	1124,4 ± 78,47	42,6
FOLFOX + polvo de concentrado de ginseng (100 mg/kg PC)	1028,6 ± 21,83	47,5
FOLFOX + polvo de concentrado de ginseng rojo (100 mg/kg PC)	913,8 ± 23,18	53,4
*P<0,01: estadísticamente significativa en comparación con FOLFOX + el Ejemplo Comparativo 2		

La Tabla 5 dada a continuación muestra los resultados del análisis bioquímico de la sangre obtenida cuando se administraron FOLFOX y el extracto de ginseng procesado a los ratones BALB / C atímicos trasplantados con células de cáncer colorrectal HT-29. En esta prueba, el fármaco se administró a los ratones durante 4 semanas, seguido de análisis bioquímico. Como resultado, se pudo apreciar que el grupo administrado con FOLFOX mostró una disminución significativa de los glóbulos blancos, los glóbulos rojos y las PLT en comparación con el grupo control. Por el contrario, en el grupo al que se administró FOLFOX en combinación con el extracto de ginseng del Ejemplo de la presente invención, se incrementaron los valores hematológicos reducidos por FOLFOX. Por lo tanto, los extractos de ginseng de los ejemplos de la presente invención mostraron valores hematológicos altos en comparación con el concentrado de ginseng convencional, el polvo de concentrado de ginseng o el polvo del concentrado de ginseng rojo y el Ejemplo Comparativo 2.

[Tabla 5]

Resultados del análisis bioquímico de la sangre obtenida cuando se usaron FOLFOX y extracto de ginseng procesado en combinación			
Grupos de prueba (n = 5)	Glóbulos blancos (10 ³ /μl)	Glóbulos rojos (10 ³ /μl)	PLT (10 ³ /μl)
Control (solo las células HT-29)	17,0 ± 0,69	11,4 ± 0,41	1565,8 ± 42,67
FOLFOX (16:5:1 mg/kg/PC)	7,0 ± 0,3	5,7 ± 0,38	934,9 ± 33,16
FOLFOX + Ejemplo 2 (100 mg/kg PC)	10,9 ± 0,39	8,1 ± 0,38	1253,6 ± 62,49
FOLFOX + Ejemplo 3 (100 mg/kg PC)	13,9 ± 0,4*	10,5 ± 0,5*	1392,5 ± 63,36**
FOLFOX + Ejemplo 6 (100 mg/kg PC)	13,1 ± 0,51*	9,4 ± 0,46*	1352,5 ± 52,04**
FOLFOX + Ejemplo comparativo 2 (100 mg/kg PC)	9,4 ± 0,26	7,2 ± 0,37	1142,9 ± 68,01
FOLFOX + concentrado de ginseng (100 mg/kg PC)	7,9 ± 0,18	5,9 ± 0,24	991,9 ± 19,8
FOLFOX + polvo de concentrado de ginseng (100 mg/kg PC)	7,8 ± 0,37	6,6 ± 0,21	1012,6 ± 12,05
FOLFOX + polvo de concentrado de ginseng rojo (100 mg/kg PC)	8,8 ± 0,38	6,8 ± 0,18	1040,7 ± 29,22

*P<0,01, **P<0,05: estadísticamente significativa en comparación con FOLFOX + el Ejemplo Comparativo 2

- 5 La Tabla 6 dada a continuación muestra los resultados del análisis de los cambios en la toxicidad renal y la toxicidad hepática cuando se administraron FOLFOX y el extracto de ginseng procesado a los ratones BALB / C atímicos trasplantados con células de cáncer colorrectal HT-29. En esta prueba, el fármaco se administró a los ratones durante 4 semanas, seguido de análisis los valores de BUN (nitrógeno ureico en sangre), un índice para evaluar la función renal, de creatinina, y de AST y ALT, los índices para la evaluación de toxicidad en el hígado. Como resultado, se pudo apreciar que, en el grupo de FOLFOX, los valores de BUN, creatinina, AST y ALT aumentaron significativamente en comparación con los del grupo control, lo que sugiere que la toxicidad renal y la toxicidad en el hígado aumentaron significativamente. Por el contrario, en los grupos a los que se administró FOLFOX en combinación con el extracto de ginseng del Ejemplo de la presente invención, los valores de toxicidad renal y de toxicidad hepática que aumentaron con FOLFOX se redujeron significativamente. Por lo tanto, los extractos de ginseng de los ejemplos de la presente invención redujeron significativamente la toxicidad renal y la toxicidad hepática en comparación con el concentrado de ginseng convencional, el polvo de concentrado de ginseng o el polvo del concentrado de ginseng rojo y el Ejemplo Comparativo 2.

[Tabla 6]

Resultados del análisis de los cambios en la toxicidad renal y la toxicidad hepática cuando se usaron FOLFOX y extracto de ginseng procesado en combinación				
Grupos de prueba (n = 5)	BUN (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
Control (solo las células HT-29)	5,62 ± 0,27	5,56 ± 0,26	33,98 ± 0,94	8,10 ± 0,46
FOLFOX (16:5:1 mg/kg/PC)	57,14 ± 2,30	15,94 ± 0,85	97,98 ± 4,11	27,18 ± 1,85
FOLFOX + Ejemplo 2 (100 mg/kg PC)	39,48 ± 1,54	12,12 ± 0,58	56,58 ± 1,79	19,32 ± 1,38
FOLFOX + Ejemplo 3 (100 mg/kg PC)	26,36 ± 1,28*	8,54 ± 0,55*	40,04 ± 1,88*	15,48 ± 0,78*
FOLFOX + Ejemplo 6 (100 mg/kg PC)	33,08 ± 1,51 *	12,68 ± 0,81	55,68 ± 1,48	20,98 ± 1,55

(continuación)

FOLFOX + Ejemplo comparativo 2 (100 mg/kg PC)	42,42 ± 1,70	13,60 ± 0,77	63,50 ± 4,29	21,90 ± 1,04
FOLFOX + concentrado de ginseng (100 mg/kg PC)	52,64 ± 2,36	15,66 ± 0,40	93,06 ± 3,24	26,34 ± 1,88
FOLFOX + polvo de concentrado de ginseng (100 mg/kg PC)	54,10 ± 3,33	15,72 ± 0,35	94,10 ± 3,98	24,30 ± 1,90
FOLFOX + Polvo de concentrado de ginseng rojo (100 mg/kg PC)	46,66 ± 1,86	15,38 ± 0,39	90,66 ± 6,08	26,38 ± 1,88
*P<0,01: estadísticamente significativa en comparación con FOLFOX + el Ejemplo Comparativo 2				

Aplicabilidad industrial

- 5 Los efectos farmacológicos del ginseng fueron encontrados tras muchos estudios, y desde el año 2000 se han desarrollado varias tecnologías de procesamiento de ginseng y tecnologías de fermentación de ginseng, que no son simples procedimientos de extracción o procesamiento. A pesar del desarrollo de varias tecnologías de este tipo no se están produciendo productos de ginseng de alto valor añadido. Esto es porque existe un problema de eficiencia asociada en la producción en masa y no se ha establecido un procedimiento de producción estandarizado.
- 10 Pharmaton (Boehringer Ingelheim, Alemania), que es un producto de ginseng típico, es un producto producido mediante un simple proceso de extracción de ginseng, pero su valor de ventas anuales es superior a 500 billones de dólares. Esto es porque Pharmaton se produce mediante un proceso de producción estandarizado de manera que tenga un contenido de ginsenósidos constante. Por lo tanto, un proceso de producción estandarizado para un
- 15 producto de ginseng es muy importante y la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de un ginseng procesado o extracto de ginseng procesado que tiene contenidos incrementados de los ginsenósidos Rg3 y Rh2 mediante un proceso de producción estandarizado. Además, la presente invención proporciona una composición de suplemento anticancerosa que comprende el ginseng procesado o extracto de ginseng procesado preparado mediante el procedimiento de la presente invención y puede aplicarse al desarrollo de productos de

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación un ginseng procesado o extracto de ginseng procesado que tiene contenidos incrementados de los ginsenósidos Rg3 y Rh2, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 (a) inocular una cepa de *Aspergillus niger* en un medio compuesto de ginseng y salvado de trigo;
 (b) cultivar la cepa de la etapa (a);
 (c) purificar y concentrar el material cultivado de la etapa (b) mediante ultrafiltración;
 (d) separar una solución de enzima o enzimas a partir del material purificado y concentrado de la etapa (c);
 (e) añadir la solución enzimática o las enzimas de la etapa (d) al ginseng, ginseng rojo o un extracto de ginseng o de ginseng rojo para obtener una mezcla;
- 10 (f) fermentar la mezcla de la etapa (e);
 (g) separar el material fermentado de la etapa (f) mediante la adición de alcohol para obtener un sobrenadante;
 (h) concentrar el sobrenadante de la etapa (g);
 (i) hacer reaccionar el concentrado de la etapa (h) con al menos un ácido orgánico seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico y ácido tartárico; y
 (j) neutralizar, añadir alcohol, filtrar, purificar, concentrar y secar el producto de reacción de la etapa (i).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la inoculación del medio con *Aspergillus niger* en la etapa (a) se realiza de tal manera que el número de esporas en una suspensión de esporas de *Aspergillus niger* es 5×10^5 esporas por g del medio y el contenido inicial de agua del medio se mantiene en un 50-80 %.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la ultrafiltración en la etapa (c) se lleva a cabo utilizando una membrana que tiene un peso molecular de corte de 100 kDa.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la enzima producida en las etapas (c) y (d) comprende β -glucosidasa y α -ramnosidasa mezcladas en una relación en peso (g / g) de 3: 1 a 8: 1.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la adición de la enzima en la etapa (e) se lleva a cabo mediante la adición de la enzima de la etapa (d) en una cantidad de 5-20 % en base al peso del ginseng, el ginseng rojo o el extracto de ginseng o de ginseng rojo.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido orgánico en la etapa (i) se añade a una solución de 10 % del concentrado de la etapa (h) en agua purificada en una cantidad de 1-50 % en peso en base al peso de la solución de concentrado y la reacción en la etapa (i) se lleva a cabo a una temperatura de 40 ~ 80 °C durante 2-18 horas.
- 30 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fermentación en la etapa (f) se lleva a cabo a una temperatura de 25 ~ 60 °C durante 6-24 horas.
8. A ginseng procesado o extracto de ginseng procesado preparado mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y que tiene contenidos incrementados de los ginsenósidos Rg3 y Rh2.
- 35 9. Una composición para su uso como un suplemento en el tratamiento del cáncer, que comprende el ginseng procesado o extracto de ginseng procesado de la reivindicación 8 como ingrediente activo.
10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la composición se usa en combinación con un agente anticanceroso.
- 40 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el agente anticanceroso es uno o más seleccionados de entre cisplatino, carboplatino, paraplatino, oxaliplatino, nedaplatino, doxorubicina, taxol, tamoxifeno, camtobell, adrucil, glivec, etopósido, zometa, oncovin, lupron, gemzar, 5-fluorouracilo, leucovorina e irinotecán.
- 45 12. Una composición farmacéutica que comprende el ginseng procesado o extracto de ginseng procesado de la reivindicación 8 como ingrediente activo.

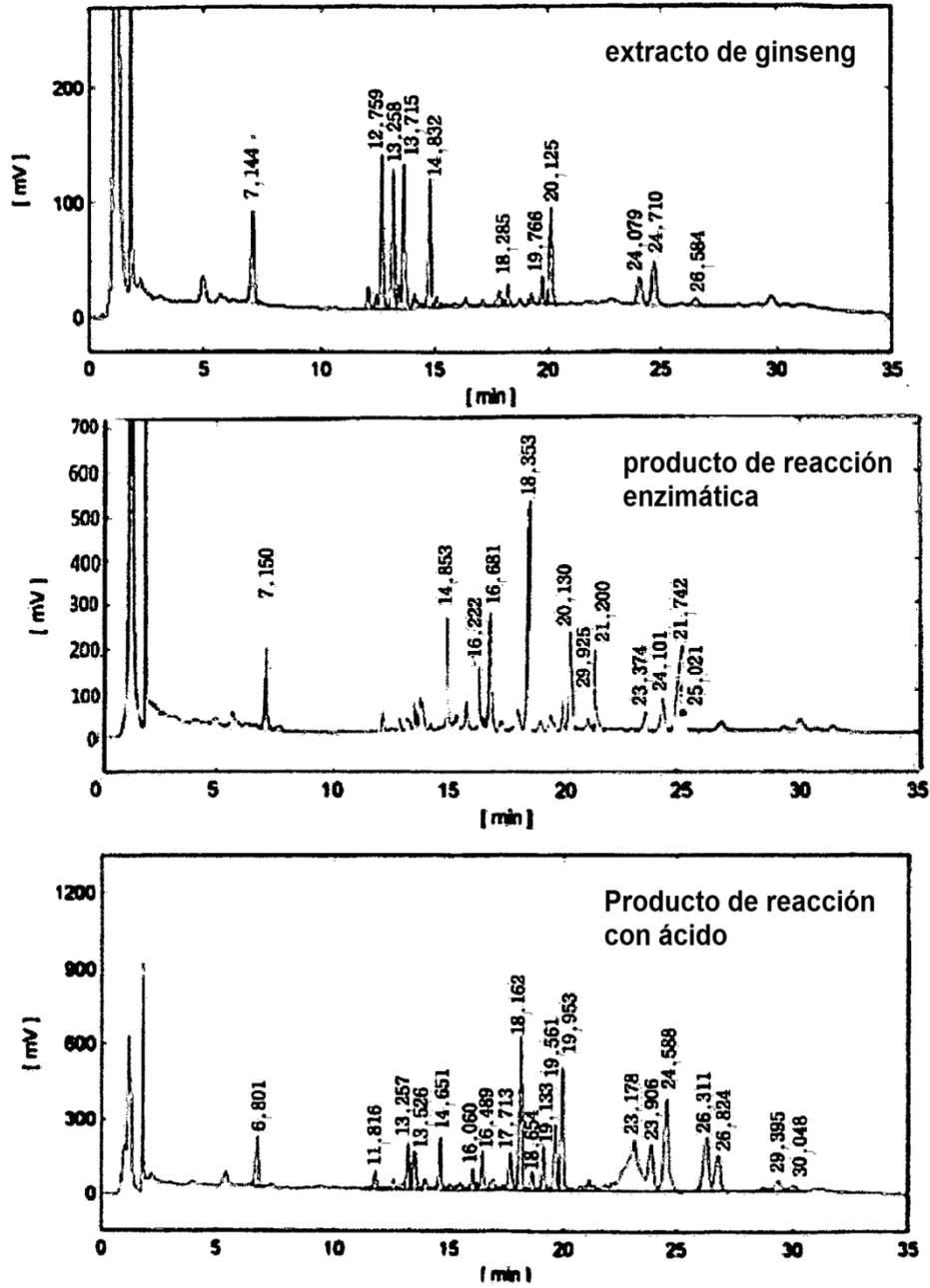


Fig.1

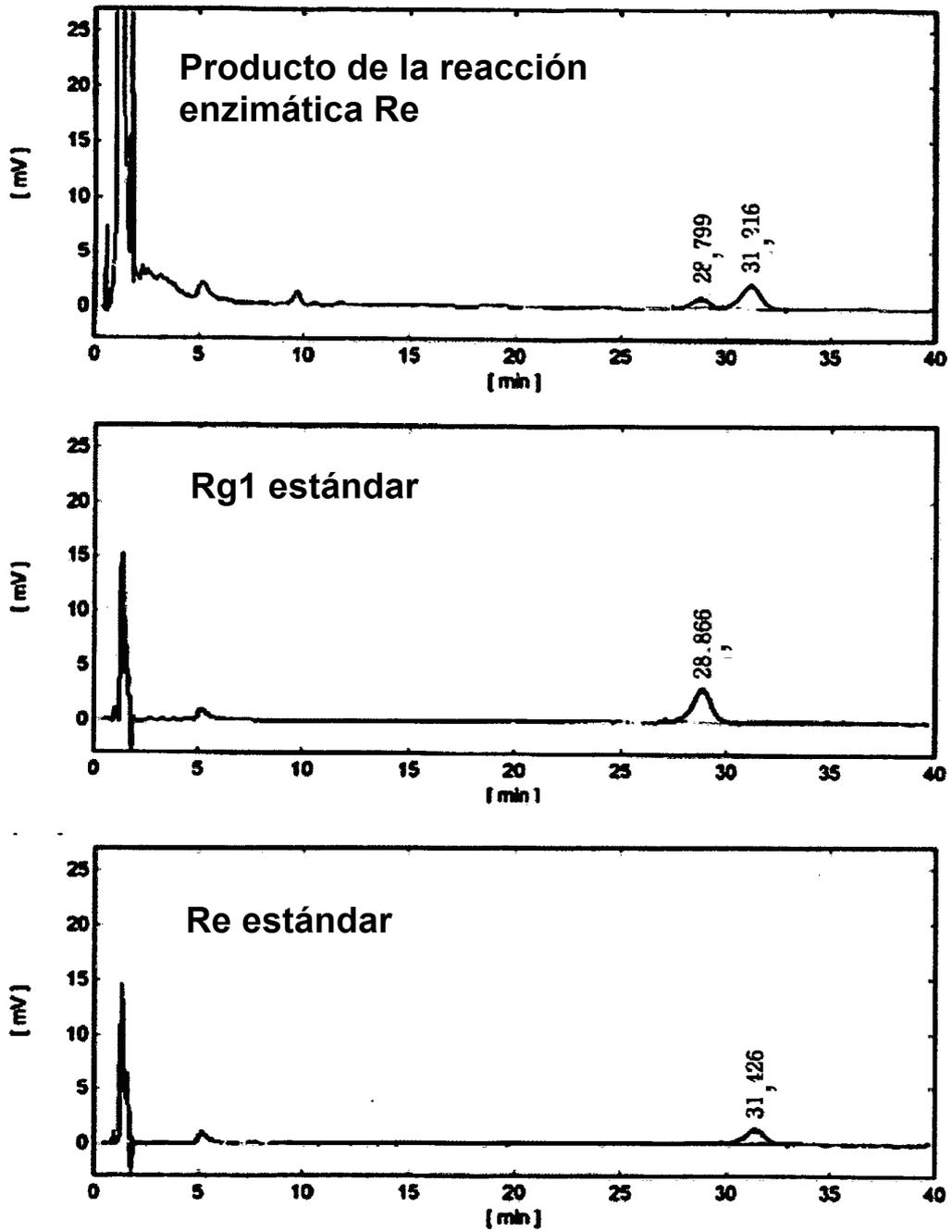


Fig.2

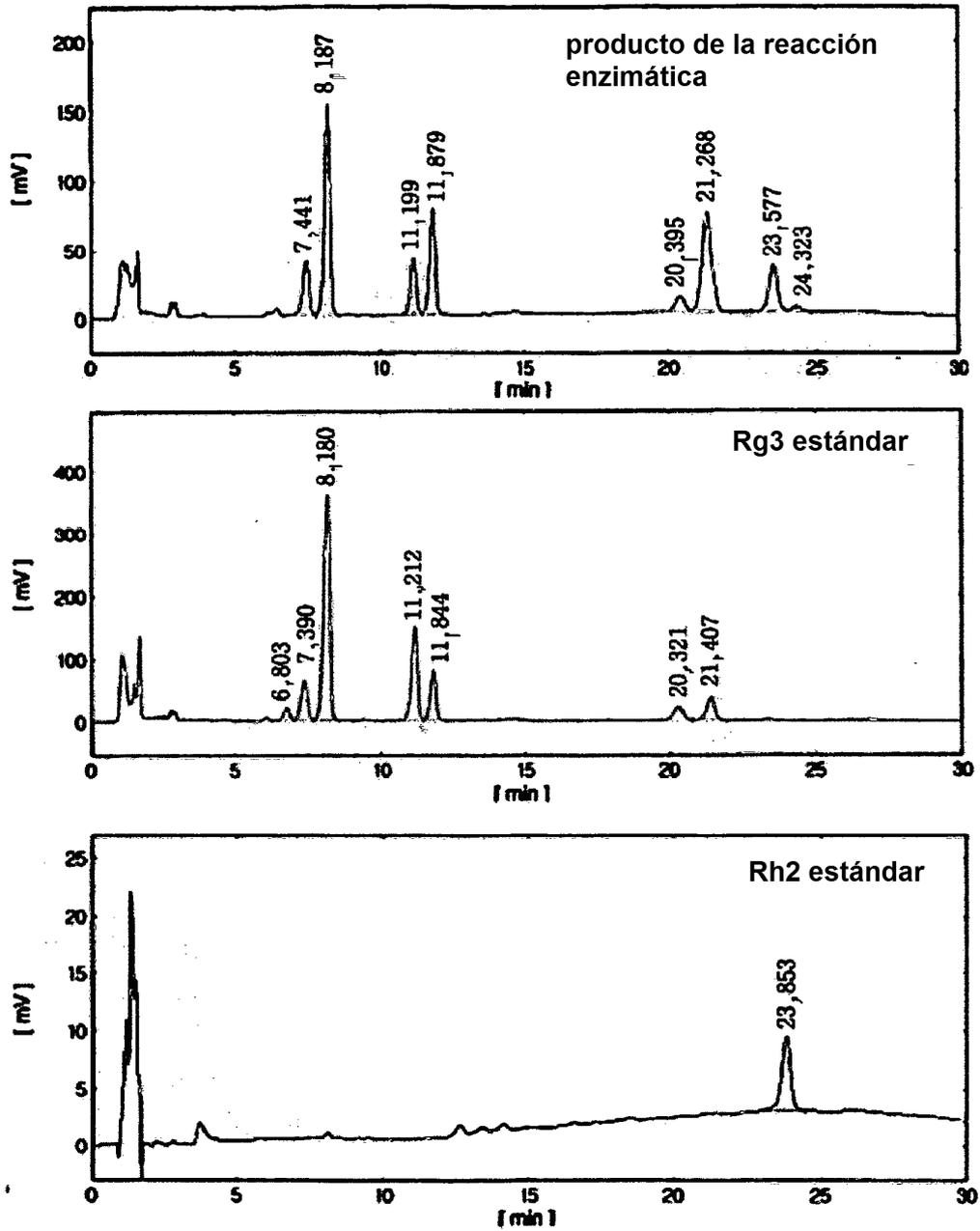


Fig.3

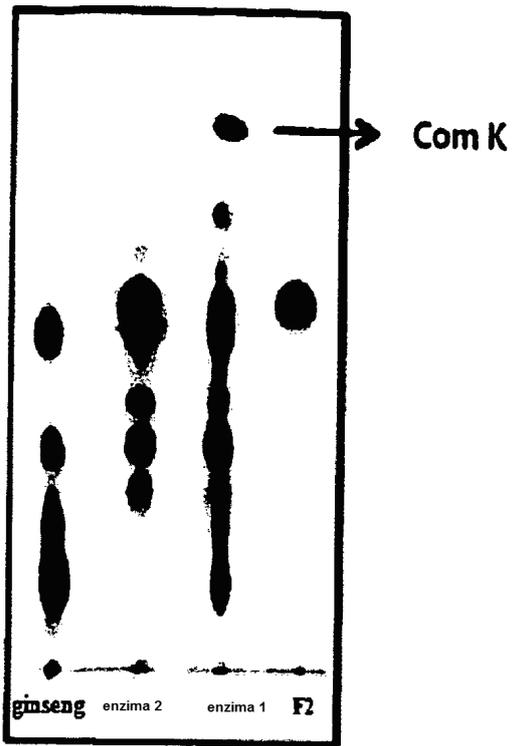


Fig.4

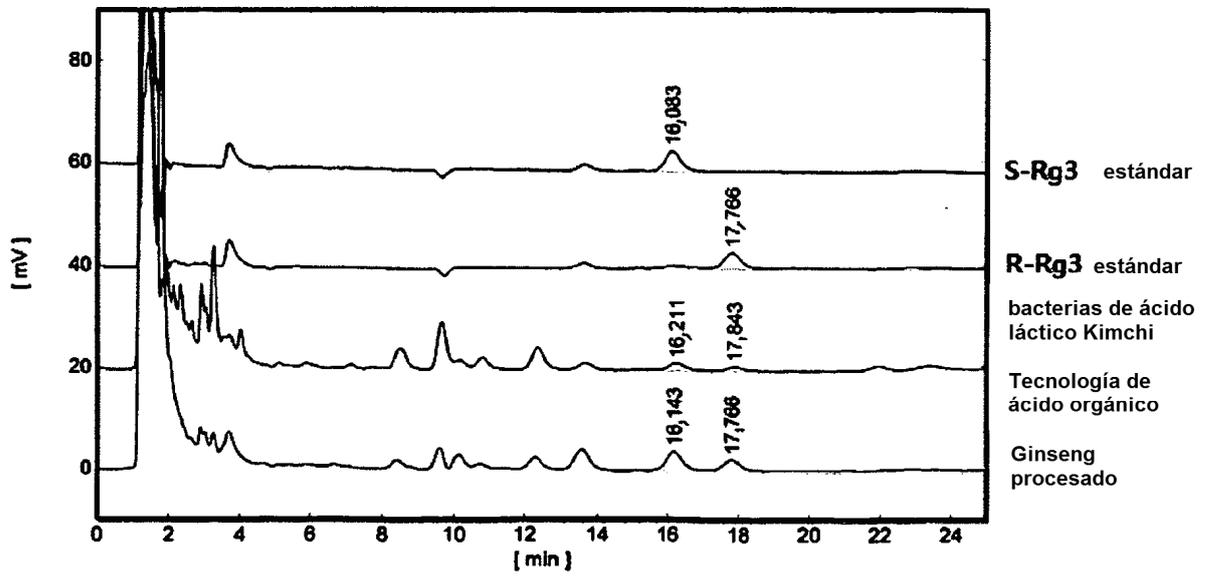


Fig.5

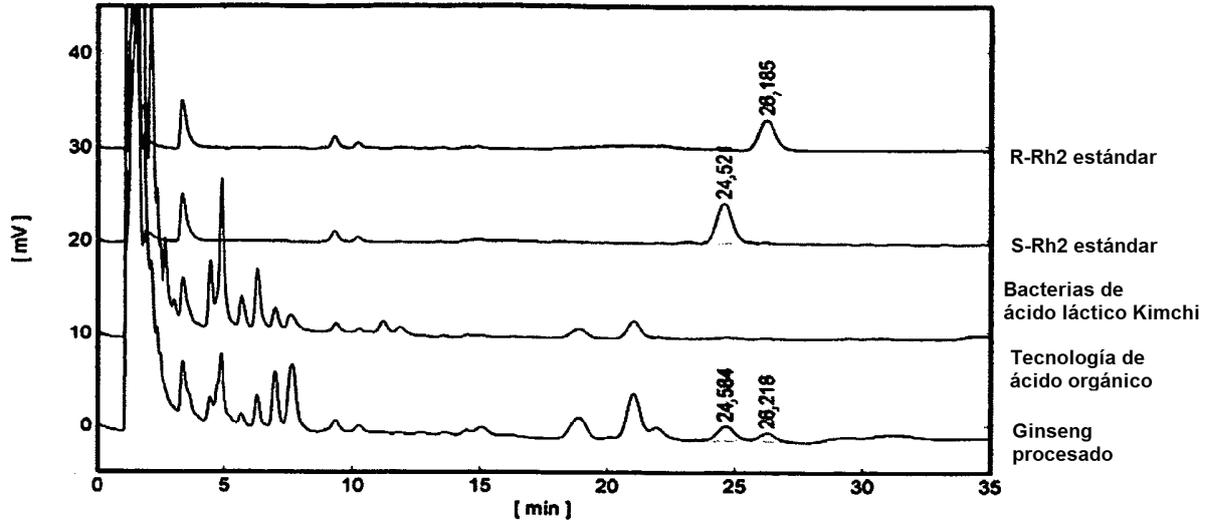


Fig.6