

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 232**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/60** (2006.01)

**A61Q 19/02** (2006.01)

**A61P 17/18** (2006.01)

**A61K 8/97** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2007 PCT/KR2007/005454**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2009 WO09057836**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2007 E 07833762 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2203151**

54 Título: **Uso de inhibidores de biosíntesis de melanina a partir de ginseng para el blanqueo de la piel**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.09.2017**

73 Titular/es:

**AMOREPACIFIC CORPORATION (100.0%)  
181, HANGANG-RO 2-GA YONGSAN-GU  
SEOUL 140-777, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, JUN SEONG;  
PARK, HYE YOON;  
AHN, SOO MI;  
KANG, BYUNG YOUNG;  
LEE, JIN YOUNG;  
KIM, EUN JOO;  
KIM, DUCK HEE y  
JANG, IH SEOP**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 634 232 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**

Uso de inhibidores de biosíntesis de melanina a partir de ginseng para el blanqueo de la piel

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de ginsenósido F1 obtenido a partir de un extracto de ginseng usando un ácido, una base, una enzima o un microorganismo que produce la enzima, para el blanqueo de la piel.

**10 Antecedentes de la técnica**

Diversos factores están implicados en determinar el color de la piel humana y, entre ellos, factores como la actividad de los melanocitos, que producen pigmentos de melanina, la distribución de vasos sanguíneos, el grosor de la piel y la presencia o ausencia de pigmentos (por ejemplo, carotenoide, bilirrubina, etc.) en el cuerpo humano son de importancia. El factor más importante entre ellos es la melanina de pigmento negro, que es producida por la acción de diversas enzimas como tirosinasa en melanocitos humanos. La formación del pigmento de melanina está influenciada por factores genéticos, secreción de hormonas, factores fisiológicos asociados con el estrés y factores medioambientales como la irradiación de luz UV.

El pigmento melanina, que es producido en células de melanina por la piel del cuerpo, es un polímero fenólico que tiene un complejo de un pigmento negro y una proteína. Bloquea los rayos ultravioletas del sol para proteger los órganos de la piel bajo a dermis y, al mismo tiempo, suprime los radicales libres generados en los tejidos de la piel con el fin de proteger las proteínas y genes en la piel. Sin embargo la melanina, producida por estímulos de tensiones internas o externas en la piel, es una sustancia estable, que no es suprimida incluso cuando desaparecen las tensiones, hasta que es desechada al exterior por la queratinización de la piel. Por tanto, cuando la melanina es producida en una cantidad innecesariamente grande, se producirán hiperpigmentaciones, como decoloración, pecas y manchas, que son desfavorables en términos de belleza. A medida que las personas que les gusta las actividades al aire libre han aumentado, con un aumento de la población con ocio, ha aumentado la necesidad de prevenir la pigmentación de melanina provocada por la luz UV. Con el fin de satisfacer esta necesidad, se han usado ácido ascórbico, ácido kójico, albutina, hidroquinona, glutatión o sus derivados o sustancias que tienen una actividad inhibitoria de tirosinasa en productos cosméticos o fármacos. Sin embargo, su uso ha estado limitado debido a unos insuficientes efectos blanqueadores y diversos problemas, como problemas de seguridad para la piel y problemas de formulación y estabilidad que se producen cuando son añadidos a productos cosméticos.

**35 Divulgación**Problema técnico

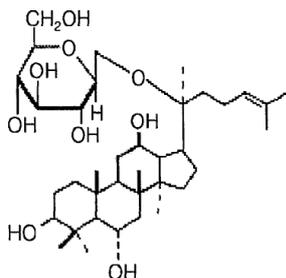
Consecuentemente, los presentes inventores han realizado muchos estudios para preparar una composición cosmética blanqueadora que es derivada de sustancias que se producen de forma natural, que sea segura para la piel y, al mismo tiempo, que tenga un excelente efecto blanqueador y una excelente estabilidad del producto. Como resultado, los presentes inventores han encontrado que el ginsenósido F1 obtenido permitiendo que un extracto de plantas, particularmente extracto de ginseng, reacciones con un ácido, un álcali o una enzima, tiene un efecto excelente para reducir la biosíntesis de melanina, completando así la presente invención.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención examinar el efecto inhibitorio de la biosíntesis de melanina de ginsenósido F1 obtenido permitiendo que el extracto de planta reaccione con un ácido, un álcali o una enzima.

Solución técnica

La presente invención proporciona el uso de ginsenósido F1 representado por la siguiente fórmula 1 para el blanqueo de la piel:

[Fórmula 1]



En lo que sigue, se describirá en detalle la presente invención.

El ginsenósido F1 se obtiene a partir de extracto de plantas. Particularmente, el ginsenósido F1 se obtiene a partir de ginseng, ginseng rojo, ginseng blanco, ginseng fresco, tallos de ginseng, hojas de ginseng o frutos de ginseng.

5 El extracto que se usa en la presente invención puede ser preparado de la siguiente manera. Se añade un disolvente orgánico a una planta en una cantidad de aproximadamente 1-6 veces y, preferentemente, aproximadamente 3 veces el peso de la planta, y la planta es desgrasada en una cantidad de aproximadamente 1-8 veces y, preferentemente, aproximadamente 4 veces el peso de la planta desgrasada, y la planta desgrasada es  
10 extraída 1-5 veces bajo reflujo. El extracto es incubado a 10-20°C durante 1-3 días y seguidamente es separado en forma de un residuo y un filtrado mediante filtración y centrifugación. El filtrado separado se concentra bajo presión reducida y el concentrado se pone en suspensión en agua y seguidamente se trata, por ejemplo, con etanol, para separar pigmentos del mismo. Seguidamente, la capa acuosa se extrae 1-5 veces con un disolvente orgánico y seguidamente la capa de disolvente orgánico obtenida se concentra bajo presión reducida para obtener un extracto  
15 de disolvente orgánico. El extracto de disolvente orgánico se disuelve en una pequeña cantidad de metanol o similar y seguidamente se le añade una gran cantidad de acetato de etilo. El precipitado producido se seca, obteniéndose así el extracto de la presente invención. El disolvente orgánico que se usa en la presente invención es preferentemente un disolvente único seleccionado entre el grupo que consiste en metanol anhidro, metanol hidratado, etanol anhidro y etanol hidratado, o un disolvente mixto de uno de los metanoles anteriormente  
20 mencionados y uno de los etanoles anteriormente mencionados.

El extracto es hidrolizado usando un ácido, una base, una enzima o un microorganismo que produzca la enzima, preparando así el ginsenósido F1.

25 Cuando se usa el ácido, puede ser al menos un ácido seleccionado entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico o una mezcla de dicho ácido con al menos un alcohol seleccionado entre el grupo que consiste en etanol, metanol y butanol. El alcohol que se usa en la mezcla ácido-alcohol es preferentemente etanol a. 50%. Al extracto, se añade una solución de ácido 0,1-2 N (preferentemente una solución de ácido 1 N) o la mezcla ácido-alcohol, si se añade, y seguidamente el extracto se hidroliza calentando bajo reflujo en un baño con agua a  
30 una temperatura de 50-100°C (preferentemente 80°C) durante 0,5-2 horas.

35 Cuando se usa una base, puede ser al menos una base seleccionada entre el grupo que consiste en hidróxido de sodio e hidróxido de potasio, o una mezcla de dicha base con al menos un alcohol seleccionado entre el grupo que consiste en etanol, metanol y butanol. El alcohol que se usa en la mezcla de base-alcohol es preferentemente butanol a. 50%. %. Al extracto, se añade una solución de ácido 0,1-2 N (preferentemente una solución de ácido 1 N) o la mezcla ácido-alcohol, si se añade, y seguidamente el extracto se hidroliza calentando bajo reflujo en un baño con agua a una temperatura de 50-100°C (preferentemente 100°C) durante 1-12 horas.

40 Cuando se usa la enzima, puede ser al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en  $\beta$ -glucosidasa,  $\alpha,\beta$ -arabinosidasa,  $\alpha,\beta$ -ramnosidasa,  $\beta$ -glucuronisasa,  $\beta$ -galactosidasa y amiloglucosidasa. El extracto se disuelve en un volumen de 5-20 veces (preferentemente de forma aproximada un volumen de 10 veces) de una solución tamponante ácida y seguidamente se le añade la enzima. Seguidamente, el extracto es agitado en un baño con agua a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 1-60 horas y, al mismo tiempo, se examina la velocidad de eliminación del sustrato mediante cromatografía de capa fina. Cuando es sustrato está completamente eliminado,  
45 el extracto se calienta en agua caliente a 80-100°C durante 5-15 minutos. Seguidamente se termina la reacción de hidrólisis y se recoge la solución de la reacción.

50 Cuando se usa el microorganismo, puede ser un microorganismo que produce dicha enzima. Más específicamente, el microorganismo puede ser seleccionado entre el grupo que consiste en aspergillus sp, bacillus sp, pinicillium sp., rhizopus sp., rhizomucor sp., talaromyces sp., bifidobacterium sp., mortierella sp., Cryptococcus sp., microbacterium sp., etc. El extracto se disuelve en un volumen de 5-10 veces (preferentemente un volumen de aproximadamente 10 veces) de agua ionizada y seguidamente se esteriliza a 121°C durante 30 minutos y se enfría a 30°C. Los microorganismos previamente cultivados son inoculados en la solución de extracto en una cantidad de 5-10% en peso basado en el peso de la solución de extracto y se cultivan a 30°C durante 2-5 días. Seguidamente, se examina  
55 la velocidad de depuración del sustrato mediante cromatografía de capa fina y, cuando el sustrato está completamente eliminado, se completa la reacción y seguidamente la solución de la reacción se centrifuga a 5.000-10.000 rpm. El precipitado recogido se lava tres veces con agua destilada, obteniéndose así un precipitado.

60 Después de que se lleva a cabo la reacción de hidrólisis como se describe anteriormente usando un ácido, una base, una enzima o un microorganismo que produce la enzima, la solución de la reacción se concentra bajo presión reducida para separar el disolvente. Al residuo se le añade un alcohol seleccionado entre el grupo que consiste en metanol, etanol y butanol y la solución se agita 1-5 veces. Seguidamente, las sales precipitadas se separan por filtración y el filtrado se concentra bajo presión reducida, obteniéndose así ginsenósido F1.

65 Efectos ventajosos

El ginsenósido F1 derivado de ginseng F1 (20-O-β-D-glucopiranosil-20(s)-protopanaxatriol) que es proporcionado según la presente invención tiene los efectos de inhibir la producción de melanina y mejorar la pigmentación. Debido a estos efectos, el ginsenósido F1 (20-O-β-D-glucopiranosil-20(s)-protopanaxatriol) puede ser usado ventajosamente en composiciones cosméticas para inhibir la producción de melanina y mejorar la pigmentación producida por la luz UV.

### Mejor modo

En lo que sigue, se describirá la presente invención más en detalle haciendo referencia a ejemplos y ejemplos de ensayo.

#### Ejemplo de referencia 1: Preparación de extracto de ginseng

Se añadieron 2 kg de ginseng a 4 l de solución acuosa de metanol y se extrajeron 3 veces bajo reflujo, seguido de incubación a 15°C durante 1 día. Seguidamente, la planta extraída se separó en forma de un residuo y un filtrado a través de filtración mediante tela filtrante y centrifugación y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El concentrado se puso en suspensión en agua y seguidamente se extrajo cinco veces con 1 l de etanol para separar pigmentos del mismo y la capa acuosa se extrajo tres veces con 500 ml de 1-butanol. La capa de 1-butanol total resultante se concentró bajo presión reducida para obtener un extracto de 1-butanol que seguidamente se disolvió en una cantidad pequeña de metanol y se añadió a una gran cantidad de acetato de etilo. El precipitado producido se secó, proporcionando así 100 g de un extracto de ginseng.

#### Ejemplo 1: Preparación de ginsenósido F1 mediante hidrólisis ácida

Se añadieron 10 g del extracto de ginseng obtenido en el ejemplo de referencia 1 a un volumen de 20 veces (v/p) de una solución de HCl 1 N-metanol al 50% (v/v) y se hidrolizó calentando bajo reflujo en un baño con agua a 80°C durante 8 horas. Seguidamente, la solución de la reacción se concentró bajo presión reducida para separar el disolvente y el residuo se añadió a 100 ml de etanol y se agitó tres veces. Seguidamente las sales precipitadas se separaron por filtración y el filtrado se concentró bajo presión reducida, obteniéndose así un producto en bruto. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice (cloroformo:metanol = 8:1-4:1), obteniéndose así 1,25 g de ginsenósido F1.

#### Ejemplo 2: Preparación de ginsenósido F1 mediante hidrólisis básica

Se disolvieron 10 g del extracto de ginseng obtenido en el ejemplo de referencia 1 en 500 ml de piridina seca y se le añadieron 10 g de polvo de metóxido de sodio. Seguidamente, la solución se hidrolizó calentando bajo reflujo en un baño con agua durante 8 horas y la solución de reacción se concentró bajo presión reducida para separar el disolvente. El residuo se añadió a 200 ml de etanol y se agitó tres veces. Las sales precipitadas se separaron por filtración. El filtrado se concentró bajo presión reducida, obteniéndose así un producto en bruto. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice (cloroformo:metanol = 8:1-4:1), obteniéndose así 0,85 g de ginsenósido F1.

#### Ejemplo 3: Preparación de ginsenósido F1 mediante hidrólisis enzimática

Se disolvieron 10 g de extracto de ginseng obtenido en el ejemplo de referencia 1 en 100 ml de una solución 0,1 M de ácido acético (pH 4,5) y 2,5 g de enzimas (0,5 g de hesperidinas, 0,5 g de naringinas, 0,5 g de celulosa, 0,2 g de β-glucuronidasa y 0,3 g de amiloglucosidasa; fabricadas por la empresa Sigma). Seguidamente, la solución se agitó en un baño con agua a 37°C durante 48 horas y se calentó en agua caliente a 80-100°C durante 10 minutos. Tras completarse la reacción, la solución de la reacción se concentró bajo presión reducida para separar el disolvente y el residuo se añadió a 200 ml de etanol y se agitó tres veces. El precipitado se separó por filtración y el filtrado se concentró bajo presión reducida, obteniéndose así un producto en bruto. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice (cloroformo:metanol = 8:1-4:1), obteniéndose así 0,91 g de ginsenósido F1.

#### Ejemplo 4: Preparación de ginsenósido F1 usando microorganismos

Se disolvieron 10 g de extracto de ginseng obtenido en el ejemplo 1 en 100 ml de agua ionizada y esterilizada a 121°C durante 30 minutos, seguido de enfriamiento a 30°C. Seguidamente se inoculó *Aspergillus niger* KCCM 11885 previamente cultivado en la solución de extracto en una cantidad de 5-10% p basada en el peso de la solución de extracto y se cultivó a 30°C durante 5 días. Seguidamente, se examinó la velocidad de eliminación del sustrato mediante cromatografía de capa fina y, cuando el sustrato estuvo completamente eliminado, se completó la reacción. El cultivo se centrifugó a 5.000-10.000 rpm y el precipitado recogido se lavó tres veces con agua destilada y seguidamente se centrifugó para recoger la solución de la reacción en forma de un precipitado. Seguidamente, el precipitado se añadió a 200 ml de etanol y se agitó tres veces. Seguidamente, el precipitado se separó por filtración y el filtrado se concentró bajo presión reducida, obteniéndose así un producto en bruto. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice (cloroformo:metanol = 8:1-4:1), obteniéndose así 0,62 g

de ginsenósido.

Ejemplo de ensayo 1: Medición del efecto inhibidor de la producción de melanina usando melanocitos de ratón

5 Melanocitos de ratón (células Mel-Ab) derivados de ratones C57BL/6 fueron cultivados en DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) que contenía 10% de suero bovino fetal, 2-O-tetradecanoilforbol-13-acetato 10 nM y toxina del cólera 1 nM, en condiciones de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células Mel-Ab cultivadas fueron desprendidas usando tripsina-EDTA al 0,25% y se cultivaron en una placa de 24 pocillos a una concentración de 10<sup>5</sup> células/pocillo. Durante 3 días desde 2 días después del comienzo del cultivo, se añadieron 10 ppm de cada una de las sustancias del ensayo (ácido kójico, ejemplo de referencia 1 y ejemplos 1 a 4) a las células que estaban siendo cultivadas. En este caso, el ácido kójico se usó como un grupo testigo con el fin de examinar el efecto inhibidor de producción de melanina de ginsenósido F1 de la presente invención.

15 El medio se separó y las células se lavaron con PBS y se lisaron con hidróxido de sodio 1 N. La absorbancia de las células se midió a 400 nm y seguidamente se calculó la proporción inhibidora de producción de melanina (%) de cada muestra del ensayo según la ecuación resultante 1. Los resultados del cálculo se muestran en la Tabla 1 siguiente (método de Dooley).

[Ecuación 1]

20 Proporción inhibidora de la producción de melanina (%) = 100 - (absorbancia de cada muestra de ensayo/absorbancia de grupo testigo x 100)

[Tabla 1]

25

Efecto inhibidor de la producción de melanina	
Muestras de ensayo	Velocidad inhibidora de producción de melanina (%)
Ejemplo de referencia 1	21,3
Ejemplo 1	35,1
Ejemplo 2	33,6
Ejemplo 3	34,2
Ejemplo 4	34,9
Ácido kójico	30,5

30 Como se puede observar en la Tabla 1 anterior, el ginsenósido F1 según la presente invención mostró una excelente velocidad inhibidora de producción de melanina (%) en comparación con el ácido kójico del agente blanqueador existente. Además, se puede observar que la proporción inhibidora de producción de melanina (%) era casi similar entre los métodos de hidrólisis para preparar ginsenósido F1 a partir del extracto de ginseng.

Ejemplo de ensayo 2: Ensayo del efecto blanqueador sobre la piel humana

35 Una cinta opaca que tenía un orificio perforado de 1,5 cm de diámetro fue unida al brazo superior de cada uno de 12 hombres sanos. Seguidamente se irradiaron rayos UV (UVB) a cada uno de los sujetos a una dosis 1,5-2 veces mayor que la dosis de eritema mínima, induciendo así el blanqueo de la piel.

40 Después de la irradiación UV, se aplicó una solución al 1% p de cada una de las muestras de ensayo (1,3-butilenglicol:etanol = 7:3, como vehículo) a la piel de cada sujeto. Como grupos testigos negativo y positivo, se aplicó una solución al 3% de cada uno de ácido kójico y un vehículo a la piel de cada sujeto. No se aplicó un grupo testigo con algo, y se observó el cambio en el estado de la piel del sujeto durante 10 días. El color de la piel se midió con un colorímetro (Minolta, Japón) a un intervalo de 1 semana. Seguidamente se calculó la diferencia ( $\Delta L^*$ ) en el color de la piel entre el punto de tiempo de aplicación y el punto de tiempo de completión de la aplicación de cada muestra se calculó según la siguiente ecuación 2, y los resultados de los cálculos se muestran en la Tabla 2 siguiente.

45 Mientras tanto, el efecto blanqueador de cada muestra se evaluó comparando  $\Delta L^*$  entre el sitio aplicado con cada muestra y el sitio testigo. En la evaluación, un valor de  $\Delta L^*$  de aproximadamente 1,5 indica que la muestra tiene un efecto blanqueador.

[Ecuación 2]

50  $\Delta L^*$  = Valor de  $L^*$  en el punto de tiempo de completión de la aplicación - valor de  $L^*$  en el punto de tiempo de comienzo de la aplicación

[Tabla 2]

Efecto blanqueador sobre la piel humana	
Muestras de ensayo	Claridad ( $\Delta L^*$ ) del color de la piel
Grupo testigo	$0,45 \pm 0,13$
Vehículo	$0,50 \pm 0,15$
Ácido kójico	$1,56 \pm 0,11$
Ejemplo de referencia 1	$1,26 \pm 0,13$
Ejemplo 1	$1,60 \pm 0,13$
Ejemplo 2	$1,67 \pm 0,17$
Ejemplo 3	$1,71 \pm 0,13$
Ejemplo 4	$1,64 \pm 0,21$

5 Como se puede observar en la Tabla 2, el ginsenósido F1 según la presente invención tenía un valor de  $\Delta L$  mayor que 1,6, sugiriendo que tenía un excelente efecto blanqueador. Además, se puede observar que el ginsenósido F1 según la presente invención tenía un excelente efecto blanqueador en comparación con el ácido kójico que se conoce que tiene un excelente efecto blanqueador.

#### 10 **Aplicación industrial**

Como se describió anteriormente, el ginsenósido F1 extraído de ginseng tiene excelentes efectos de inhibir la producción de melanina y mejorar la pigmentación producido por la luz UV.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso no terapéutico de ginsenósido F1 (20-O-β-D-glucopiranosil-20(s)-protopanaxatriol), para el blanqueo de la piel.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1, en que el ginsenósido F1 (20-O-β-D-glucopiranosil-20(s)-protopanaxatriol) es obtenido a partir de un extracto de ginseng, ginseng rojo, ginseng blanco, ginseng fresco, tallos de ginseng, hojas de ginseng o frutos de ginseng.
- 10 3. El uso de la reivindicación 2, en que el ginsenósido F1 es obtenido permitiendo que el extracto reaccione con un ácido, una base, una enzima o un microorganismo que produce la enzima.
- 15 4. El uso de la reivindicación 3, en que el ácido es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico, o una mezcla del ácido con al menos un alcohol seleccionado entre el grupo que consiste en etanol, metanol y butanol.
- 20 5. El uso de la reivindicación 3, en que la base es al menos una base seleccionada entre el grupo que consiste en hidróxido de sodio e hidróxido de potasio, o una mezcla de la base con al menos un alcohol seleccionado entre el grupo que consiste en etanol, metanol y butanol.
- 25 6. El uso de la reivindicación 3, en que la enzima es al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en β-glucosidasa, α,β-arabinosidasa, α,β-ramnosidasa, β-glucoronidasa, β-galactosidasa y amiloglucosidasa.
7. El uso de la reivindicación 3, en que el microorganismo es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en aspergillus sp, bacillus sp, pinicillium sp., rhizopus sp., rhizomucor sp., talaromyces sp., bifidobacterium sp., mortierella sp., Cryptococcus sp. y microbacterium sp.
- 30 8. El uso de la reivindicación 1, en que el ginsenósido F1 inhibe la producción de melanina.
9. El uso de la reivindicación 1, en que el ginsenósido F1 mejora la pigmentación producida por la luz UV.