



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 306**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/702** (2006.01)  
**A61K 35/23** (2006.01)  
**A61P 25/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08720152 .1**  
96 Fecha de presentación : **11.02.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2117560**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54 Título: **Una composición para la inhibición selectiva de la reabsorción de la serotonina y los procesos correspondientes.**

30 Prioridad: **12.02.2007 IN MU0255/07**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.05.2011**

73 Titular/es: **INDUS BIOTECH PRIVATE LIMITED**  
**102, Airy Apartments, 878 Bootee Street, Pune**  
**Maharashtra 411 001, IN**

72 Inventor/es: **Bhaskaran, Sunil y**  
**Vishwaraman, Mohan**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 358 306 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

Una composición para la inhibición selectiva de la reabsorción de la serotonina y los procesos correspondientes.

### Comentarios:

5 El archivo contiene la información técnica propuesta después de que la aplicación se presentará y no se incluye en esta especificación.

### CAMPO DE LA INVENCION

10 Esta invención se relaciona con una novedosa composición farmacéutica para la inhibición de la reabsorción de la serotonina, la composición que comprende glucósidos terpenoides pentacíclicos, junto con los excipientes. Esta invención se relaciona con un método de preparación de una novedosa composición farmacéutica para la inhibición de la reabsorción de la serotonina a partir de fuentes naturales. Esta invención se relaciona con el uso de una novedosa composición farmacéutica para la inhibición selectiva de la reabsorción de la serotonina. Esta invención también se relaciona con la aplicación de esta composición botánica en el tratamiento de la Depresión, como un compuesto sensorial para la elevación del estado de ánimo y otras aplicaciones donde la acción mediada de la Serotonina se involucra.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La serotonina es un neurotransmisor y juega un papel significativo en muchas funciones fisiológicas. La serotonina se involucra en la sensación de saciedad que está relacionado con la ingesta de alimentos. Esta función de la Serotonina se puede utilizar en el tratamiento de trastornos de la alimentación y la gestión relacionada con la obesidad. La serotonina también se involucra en la elevación del estado de ánimo y suministra una sensación de bienestar. Esta propiedad fisiológica se puede utilizar en aplicaciones donde esta, se puede ofrecer como un ingrediente sensorial para elevar el estado de ánimo y la sensación de bienestar. La aplicación más significativa de la Serotonina, está en el tratamiento del trastorno fisiológico, Depresión. Este neurotransmisor ofrece una sustancial ventaja para el tratamiento de una enfermedad como la depresión. Aparte de esto, la Serotonina también juega un papel en vaciado gástrico.

25 Según el NIMH (National Institute of Mental Health) USA, cerca de 18.8 millones de Adultos Americanos, que constituyen el 9.5% de la población, sufren de la enfermedad de depresión. El costo económico de este trastorno es muy alto. Sin embargo, el costo de sufrimiento Humano no se puede estimar. Un trastorno depresivo es una enfermedad que afecta al cuerpo, al estado de ánimo y el pensamiento. Existen diferentes tipos de depresión como depresión mayor, la distimia que es un tipo menos severo de depresión y Trastorno bipolar que se caracteriza por un estado de ánimo cíclico, caracterizado por varios altos (manía) y bajos (depresión).

30 Los síntomas usuales de depresión son tristeza persistente, estados de ánimos vacíos o ansiedad, sentimientos de desesperación, sentimientos de culpabilidad, falta de valor, disminución de la energía, dificultad en la concentración, Insomnio, comer demasiado, aumento de peso, pensamientos de muerte, inquietud e irritabilidad. La principal causa de depresión es la reducción en monoaminas funcionales del cerebro en la transmisión sináptica dependiente de la amina. Esto involucra monoaminas del cerebro como la Norepinefrina (NE), la Serotonina (5 HT) y la Dopamina.

35 Los métodos actuales de tratamiento son:

#### Anti-depresivos Tricíclicos

40 Estos fármacos aumentan la cantidad del neurotransmisor en el receptor al impedir su absorción en los terminales nerviosos. Esto deja más cantidad de la amina fuera de las células nerviosas que ahora son capaces de interactuar con los receptores. Los fármacos tricíclicos principalmente afectan las células que secretan la norepinefrina.

Muchos tricíclicos pueden bloquear los receptores de la Acetilcolina produciendo sequedad de boca, visión borrosa y estreñimiento. Algunos tricíclicos pueden tener efectos sedantes, adormecimiento, y aumento del riesgo de la presión sanguínea baja.

#### Inhibidores Selectivos de la Reabsorción de la Serotonina (SSRIs)

45 Este grupo de fármacos afecta a las células que liberan la 5 Hidroxitriptamina, también llamada Serotonina. Estos fármacos compensan a una cantidad inferior de la normal de la Serotonina, en algunas áreas del cerebro que los hace efectivos en el tratamiento de la depresión. Los efectos secundarios causados por estos fármacos incluyen dolor de cabeza, insomnio, diarrea, pérdida de peso, y una disminución en la función sexual.

Inhibidores de la monoamina oxidasa

5 El segundo grupo de la terapia con fármacos es, los Inhibidores de la monoamina oxidasa. La monoamina oxidasa es una enzima que degrada los neurotransmisores. El uso de estos fármacos inhibidores de la enzima conduce a una menor destrucción de las aminas en las terminaciones nerviosas, dejando así más disponibilidad para el almacenamiento y la liberación por las células nerviosas. Los efectos secundarios causados por estos fármacos incluyen la reducción en presión sanguínea, sequedad de boca, visión borrosa y estreñimiento. Estos fármacos causan muy graves reacciones con el queso y la cerveza, lo que conduce a un significativo aumento en la presión sanguínea y puede causar sangrado en el Cerebro.

10 De CN 1 583 127 A, se conoce una medicina China en la forma de inyección, polvo para inyección o perfusión para tratar la depresión y el tumor en la base de un extracto de *Centella*.

De CN 1 709 401 A, se conoce una medicina China, preparación de liberación controlada que contiene un componente efectivo soluble en agua de *Centella*. Adicionalmente, se revela que la preparación puede ser utilizada para el tratamiento de la depresión.

15 De Brinkhaus, B. et al. "Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*", se conoce el uso médico de la *Centella Asiatica*. Adicionalmente, se revela que el ácido asiático, asiaticósido, madecasósido, y asiaticósido B son los principales constituyentes de *Centella asiática*. Adicionalmente, se revela el uso de *Centella asiática* para el tratamiento de la obesidad.

20 De EP 0 383 171 A2, se conocen los derivados 2,3,23-trihidroxi-urs-12-eno. Se revela que estos derivados son útiles fármacos para la prevención y el tratamiento de trastornos cognitivos. También se revela que tienen actividad antagonista de la serotonina. Adicionalmente, se revela que el asiaticósido tiene un efecto antagonista en los receptores serotoninérgicos y que los derivados son apropiados para el tratamiento y profilaxis de trastornos cognitivos, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades del sistema nervioso central. Además, se revelan los métodos para el aislamiento de asiaticósido y madecasósido a partir de la *Centella asiática*.

25 Es aparente que la depresión está ganando importancia y los métodos actuales de tratamiento para el tratamiento de esta enfermedad están lejos de ser satisfactorios. Este trastorno es crónico en naturaleza y llama a una terapia de manejo a largo plazo. Por consiguiente, es imperativo desarrollar métodos de tratamiento más amables y gentiles derivados de fuentes botánicas para el manejo a largo plazo de este trastorno. La presente invención se dirige a la consecución de este objetivo.

## OBJETO DE LA INVENCION

30 El objeto de la presente invención es una composición farmacéutica para la inhibición de la reabsorción de la serotonina que comprende glucósidos terpenoides pentacíclicos, preferiblemente asiaticósido y madecasósido opcionalmente junto con los excipientes.

Incluso otro objeto de la presente invención es, desarrollar un proceso de preparación de la novedosa composición farmacéutica para la inhibición de la reabsorción de la serotonina.

35 Sin embargo, otro objeto de la presente invención es, obtener una novedosa composición farmacéutica para la inhibición de la reabsorción de la serotonina útil en el manejo de la depresión y los trastornos mediados por la serotonina.

Incluso otro objeto de la presente invención es, utilizar la composición para fabricar un medicamento para la inhibición de la reabsorción de la serotonina en un sujeto que lo necesite.

40 Incluso otro objeto de la presente invención es, utilizar la composición en el tratamiento de trastornos mediados por la serotonina, depresión, obesidad, vaciado gástrico, elevación del estado de ánimo y otros trastornos que implican a la serotonina en un sujeto que lo necesite.

## DECLARACION DE LA INVENCION

45 Por consiguiente, la presente invención se relaciona con una composición para la inhibición de la reabsorción de la serotonina, dicha composición que comprende el asiaticósido y el madecasósido opcionalmente junto con excipientes aceptables; un proceso para la preparación de una composición que comprende el asiaticósido y el madecasósido, en donde dicho proceso comprende las etapas de: obtención del extracto a partir de la planta *Centella asiática*, filtración y concentración del extracto, disolución del extracto concentrado en un solvente para obtener una solución, tratar la solución con los solventes para eliminar las sustancias grasas, la clorofila y otros colorantes, pasar la solución tratada a través de adsorbentes para conseguir una solución clara; y la concentración

50

de la solución clara para obtener la composición, la fabricación de un medicamento que comprende la composición junto con los excipientes y el uso de la composición en el tratamiento de trastornos mediados por la serotonina en un sujeto que lo necesite, la etapa de administración al sujeto de una cantidad farmacéuticamente aceptable de la composición.

## 5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1, representa el estómago del animal tratado con una dosis del fármaco de prueba de 30 mg/kg.

FIG. 2, representa el estómago del animal tratado con una dosis del fármaco de prueba de 60 mg/kg.

FIG. 3, representa el estómago del animal tratado con una dosis del fármaco de prueba de 120 mg/kg.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 La presente invención se relaciona con una composición para la inhibición de la reabsorción de la serotonina, dicha composición que comprende el asiaticósido y el madecasósido opcionalmente junto con los excipientes aceptables. La concentración del asiaticósido está en el rango entre 15-50% y la concentración del madecasósido está en el rango entre 20-50%.

15 En otra modalidad de la presente invención, se obtienen los glucósidos terpenoides pentacíclicos a partir de las fuentes vegetales o animales, preferiblemente a partir de la planta *Centella asiática*.

20 En incluso otra modalidad de la presente invención, los excipientes se seleccionan de un grupo que comprende agentes de granulación, agentes de enlace, agentes de lubricación, agentes desintegrantes, agentes edulcorantes, deslizantes, anti-adherentes, agentes anti-estáticos, agentes tensoactivos, anti-oxidantes, gomas, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsificantes y agentes de esferonización.

25 En incluso otra modalidad de la presente invención, dicha composición se formula en diversas formas de dosificación seleccionadas de un grupo que comprende comprimidos, comprimidos medicinales, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, ungüento, parche, gel, loción, dentífrico, cápsula, emulsión, cremas, aerosol, gotas, polvos o gránulos dispersables, emulsión en cápsulas de gelatina dura o blanda, jarabes, elixires, fitocéticos, nutraceúticos y productos alimenticios.

La presente invención también se relaciona con un proceso para la preparación de una composición que comprende el asiaticósido a una concentración que oscila entre 15-50% y el madecasósido a una concentración que oscila entre 20 - 50%, en donde dicho proceso comprende las etapas de:

- a. filtración y concentración del extracto obtenido de la planta *Centella asiática*;
- 30 b. disolución del extracto concentrado en un solvente para obtener una solución;
- c. tratar la solución con los solventes para eliminar las sustancias grasas, la clorofila y otros colorantes;
- d. pasar la solución tratada a través de un adsorbente en la columna y lavarla con un solvente para obtener el eluato; y
- e. concentración del eluato para obtener la composición.

35 En incluso otra modalidad de la presente invención, el solvente se selecciona de un grupo que comprende compuestos aromáticos heterocíclicos, compuestos alifáticos, cetonas, alcoholes, nitrilos, ésteres, éteres y mezclas de uno o más de estos.

En incluso otra modalidad de la presente invención, el solvente utilizado para la extracción es preferiblemente un alcohol alifático.

40 En incluso otra modalidad de la presente invención, la extracción se lleva a cabo a una temperatura que oscila entre 20°C y 38°C, preferiblemente a 30°C.

En incluso otra modalidad de la presente invención, la extracción se lleva a cabo durante 6h a 10h, preferiblemente durante 8h.

En incluso otra modalidad de la presente invención, la concentración se lleva a cabo a una temperatura que oscila entre 40°C y 50°C, preferiblemente a 45°C.

En incluso otra modalidad de la presente invención, el solvente es preferiblemente el agua desionizada.

5 En incluso otra modalidad de la presente invención, el solvente se selecciona de un grupo que comprende hexano, éter de petróleo y metilisobutilcetona.

En incluso otra modalidad de la presente invención, el adsorbente se selecciona de un grupo que comprende resina, carbón vegetal, sílica gel y una mezcla de estos.

En incluso otra modalidad de la presente invención, la concentración se lleva a cabo a una temperatura que oscila entre 50°C y 65°C.

10 La presente invención también se relaciona con el uso de una composición que comprende el asiaticósido a una concentración que oscila entre 15 - 50% y el madecasósido a una concentración que oscila entre 20-50% opcionalmente junto con excipientes, para fabricar un medicamento para el tratamiento de trastornos mediados por la serotonina, en un sujeto que lo necesite.

En incluso otra modalidad de la presente invención, el sujeto es un animal o ser humano.

15 En incluso otra modalidad de la presente invención, la composición se administra a una dosificación que oscila entre 15-150mg/kg de peso corporal en animales y 1-15mg/kg de peso corporal en seres humanos.

En incluso otra modalidad de la presente invención, los trastornos mediados por la serotonina son depresión, obesidad, vaciado gástrico, elevación del estado de ánimo y otros trastornos que implican a la serotonina.

En incluso otra modalidad de la presente invención, la composición es no-tóxica y libre de efectos adversos.

20 Una modalidad de la invención se relaciona con una novedosa composición farmacéutica para la inhibición de la reabsorción de la serotonina, en donde la composición comprende el asiaticósido y el madecasósido, opcionalmente con los excipientes. La concentración de asiaticósido oscila entre 15-50% y la concentración de madecasósido oscila entre 20-50%.

25 En otro aspecto de la presente modalidad, la novedosa composición es útil en el manejo de depresión y funciones mediadas por la serotonina.

Incluso otra modalidad de la presente invención, es el uso de una composición que comprende el asiaticósido a una concentración que oscila entre 15-50% y el madecasósido a una concentración que oscila entre 20-50% opcionalmente con excipientes para el tratamiento de depresión y las funciones mediadas por la serotonina en un sujeto que lo necesite. En un aspecto de la presente modalidad el sujeto es un animal incluyendo seres humanos.

30 La depresión es una enfermedad que requiere la medicación sostenida para su manejo. Los actuales métodos de tratamiento disponibles toman cerca de 2-4 semanas, antes de tener cualquier efecto. Debido a este requisito de tratamiento sostenido, los sujetos experimentan un rango de efectos secundarios que varían en severidad y duración. La presente invención se relaciona con una composición, un proceso y el uso de una composición para el tratamiento de depresión y otras funciones mediadas por la serotonina. La presente invención se involucra en el  
35 manejo de la depresión y otras funciones mediadas por la serotonina mientras que produce mínimos efectos secundarios. Como se ve en el ensayo descrito a continuación, el fármaco de prueba mostró menor agitación, y diarrea en comparación con un fármaco SSRI estándar. Adicionalmente, la presente invención no produce sedación en el sujeto.

40 La presente invención también se relaciona con el uso de una composición que comprende el asiaticósido a una concentración que oscila entre 15-50% y el madecasósido a una concentración que oscila entre 20-50%, opcionalmente junto con excipientes para fabricar un medicamento para la inhibición de la reabsorción de la serotonina en un sujeto que lo necesite. En incluso otra modalidad de la presente invención, la inhibición de la reabsorción de la serotonina es útil en el manejo de la depresión y las funciones mediadas por la serotonina. En incluso otra modalidad de la presente invención, los sujetos son animales, incluyendo los seres humanos.

45 En incluso otra modalidad de la presente invención, la composición es cualquiera un polvo o líquido y tiene mínimos efectos secundarios, en donde la composición está en un rango de dosificación de 15-150mg/kg en animales y 1-15 mg/kg en seres humanos.

5 En incluso otra modalidad de la presente invención, toda la porción terrestre de la planta *Centella asiática* incluyendo el tallo y las hojas, se lava bajo el chorro de agua caliente para eliminar todo el suelo adherido y los contaminantes y se seca bajo la sombra. El material seco se pulveriza en un molino de martillo que tiene, un tamaño de partícula de salida del material, capaz de pasar a través de una malla 16. El material pulverizado se empaqueta en un percolador vertical que tiene terminales de filtro tanto, en la parte superior como en el fondo. El solvente utilizado puede ser un alcohol, incluyendo pero no limitando a alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol propílico, alcohol isopropílico ya sea como un solvente único o en una combinación particular preferiblemente alcohol etílico solo o en combinación con alcohol isopropílico de una manera en contra corriente a temperaturas que oscilan entre 20°C y 38°C; preferiblemente a 30°C, durante un periodo de tiempo que oscila entre 8 hrs y 24 hrs, preferiblemente por 8 hrs.

10 El extracto resultante, se filtra limpio de cualquiera de las partículas visibles, a través de un filtro de malla 80 y se concentra a baja temperatura utilizando instalaciones de concentración al vacío en o alrededor de 40 °C a 50°C preferiblemente a 45°C, hasta obtener una pasta. La pasta resultante se disuelve en agua desionizada para conseguir una solución uniforme. Esta solución se extrae con un solvente, éter de petróleo o hexano, para eliminar todas las sustancias grasas. El extracto desengrasado se extrae otra vez con metil isobutilcetona para eliminar la  
15 clorofila y otros colorantes con varias veces (preferiblemente 4 veces) el volumen de aquel del extracto acuoso se utiliza aquí. El extracto acuoso limpio, a continuación se pasa a través de un lecho de resina grado absorbente y se lava libre de todos los colores y los contaminantes fuera del lecho con 5 a 15 volúmenes o más preferiblemente 8 volúmenes de agua desionizada. El lecho lavado con agua, fue eluido con un solvente alcohólico que tiene átomos de carbono que oscilan entre C-1 a C-4, preferiblemente etanol y alcohol isopropílico o una mezcla de los alcoholes  
20 mencionados.

El solvente eluido se limpió de nuevo, sobre un lecho que consiste de una capa de carbón vegetal activado y silica gel que tiene un tamaño de partícula de malla 60 -120. El solvente eluido fue recolectado y el lecho se lavó por varias ocasiones para obtener todos los glucósidos terpenoides pentacíclicos fuera del lecho. El solvente eluido se concentró bajo vacío a baja temperatura preferiblemente entre 50°C a 65°C, hasta un Polvo y el polvo resultante se  
25 suspende en una cantidad igual de agua desmineralizada y se seca por absorción para obtener un polvo Altamente soluble en agua, que tiene una composición de glucósidos terpenoides pentacíclicos principalmente el asiaticósido que oscila entre 15 a 50 % y el Madecacosido que varía entre 20 a 50 % en composición por HPLC

Un resumen del proceso de extracción descrito anteriormente es de la siguiente manera:

30 1. La planta de *Centella asiática* se lava con agua corriente para eliminar todo el suelo adherido y los contaminantes y se seca bajo la sombra.

2. El material seco se pulveriza en un molino de martillo que tiene una producción de un material de tamaño de partícula que pasa a través de una malla 16.

3. El material pulverizado se empaqueta en un percolador vertical y se extrae con un alcohol alifático a una temperatura que oscila entre 20 y 38°C, preferiblemente durante 8hrs de una manera contra corriente.

35 4. El extracto resultante se filtra limpio de cualquier partícula visible, a través de un filtro de malla 80 y se concentra a baja temperatura utilizando instalaciones de concentración al vacío en o alrededor de 40°C a 50°C, preferiblemente a 45°C, a una pasta.

5. La pasta resultante se disuelve en agua desionizada para obtener una solución uniforme.

6. Esta solución se extrae con un solvente, éter de petróleo o hexano, para eliminar todas las sustancias grasas.

40 7. El líquido anterior se extrae otra vez con metilisobutilcetona para eliminar la clorofila y otros colorantes con un volumen múltiples veces, preferiblemente 4 veces, para aquel del extracto acuoso.

8. A continuación, el extracto acuoso limpio, se pasa a través de un lecho de resina, grado absorbente

9. El lecho se lava libre de todos los colores y contaminantes fuera del lecho con 5 volúmenes o más, preferiblemente 8 volúmenes de agua desionizada.

45 10. El lecho lavado con agua fue eluido con un solvente alcohólico, que tiene átomos de carbono que oscilan entre C-1 a C-4, preferiblemente etanol y alcohol isopropílico o una mezcla de los citados alcoholes.

11. El solvente eluido se limpió de nuevo sobre un lecho que consiste de una capa de carbón vegetal activado y silica gel que tiene un tamaño de partícula de malla 60 -120.

12. El solvente eluido fue recolectado y el lecho se lavó por varias ocasiones, para obtener todos los glucósidos terpenoides pentacíclicos fuera del lecho

13. El solvente eluido se concentró a un polvo, bajo vacío a baja temperatura preferiblemente entre 50°C y 65°C.

5 14. El polvo resultante se suspende en una cantidad igual de agua desmineralizada y se seca por absorción para obtener un polvo altamente soluble en agua, que tiene una composición de glucósidos terpenoides pentacíclicos principalmente el asiaticósido que oscila entre 15 y 50% y el Madecasósido que varía entre 20 y 50% en composición por el siguiente HPLC.

Método HPLC:

Columna: 250 mm X 4.6 mm Fase reversa C-18 tamaño de partícula 5µ		
Longitud de onda de detector: 220nm		
Velocidad de flujo: 1.4 ml/min		
Estándar Utilizado: Chromadex		
Tiempo	Acetonitrilo	Agua
Inicial	75%	25%
30 mins	45%	55%
40 mins	75%	25%

10 El resultante compuesto de prueba purificado, se somete a las siguientes pruebas para determinar su actividad anti-depresiva y para establecer su modo de acción.

En el Test de Suspensión de la Cola, el compuesto de prueba mostró significativa actividad anti-depresiva, que fue medida como un porcentaje de disminución en la inmovilidad de ratones suspendidos. En una dosificación de alimentación oral de 30 mg/kg, el compuesto de prueba mostró un 40.3% de disminución en la inmovilidad. Esto muestra una prometedora capacidad de este compuesto como un anti-depresivo.

15

Otra prueba de la actividad anti-depresiva del fármaco fue visto durante la disminución en inmovilidad en la Prueba de Natación Forzada. El fármaco de prueba regresó a una reducción del 68.76% en inmovilidad una dosis oral de 30 mg/kg, en comparación con la disminución del 71.44% del fármaco anti-depresivo tricíclico del fármaco estándar dosificado a 100 mg/kg.

20 En la Prueba de Actividad Locomotora, el compuesto de prueba no mostró efectos sedantes en los ratones. Esto se evidencia por el aumento en la actividad locomotora de los ratones. La actividad anti-depresiva de este fármaco no se acompaña por la sedación y el adormecimiento.

25 El compuesto de prueba demostró su capacidad de inhibición de la reabsorción de la serotonina durante la prueba de Potenciación del 5-Hidroxitriptófano (5-HTP), en donde se aumentó significativamente el número de sacudidas de cabeza observada en los ratones. El compuesto de prueba a una dosis de 100 mg/kg, fue comparable con un SSRI estándar, a saber, la Fluoxetina a una dosis de 100 mg/kg. Aparte de esto, el fármaco de prueba, también mostró efectos secundarios minimizados en comparación con un fármaco SSRI estándar.

30 Así, el compuesto de prueba no tiene el efecto secundario habitual de MAO (Monoamina oxidasa) inhibición de la actividad. Así, este está libre de efecto secundario anticolinérgico. Tiene significativa actividad anti-depresiva dependiente de la dosis en una prueba de la suspensión de la cola, en ratones.

La invención además se elabora con la ayuda de los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no se deben interpretar para limitar el alcance de la invención.

**Ejemplo 1**

1 kilogramo de la parte aérea, que comprende principalmente las hojas y tallos de la planta *Centella asiática*, se toman en una forma limpia y seca, y se pulveriza a un tamaño asegurando que el 100% pasa a través de un molino de martillo de tamaños de malla 20. Este material fue extraído con 5 litros de alcohol isopropílico en un extractor contra corriente de lecho fijo repetidamente durante un periodo de 8hrs a 30°C. Después de 8 hrs el extracto se filtró limpio de todos los materiales suspendidos. El filtrado claro se concentró a un semisólido a 40, en un rotavapor con vacío. A la masa concentrada, se le adicionaron 3 litros de agua desionizada para obtener un líquido homogéneo. El líquido fue extraído lavándolo dos veces con 2 litros de hexano y la capa acuosa en el fondo se separó. La capa acuosa se extrajo otra vez dos veces con 1 litro de metilisobutilcetona. La capa acuosa en el fondo se separó y se pasó a través de un lecho de resina adsorbente Amberlite XAD1180 (400ml), manteniendo una velocidad de flujo de 25 ml por minuto y el flujo de salida fue monitoreado por la ausencia de glucósidos terpenoides.

La columna se lavó cuidadosamente con 5 litros de Agua desmineralizada hasta que los lavados sean incoloros. La columna adsorbente fue eluida con alcohol etílico hasta que la prueba de TLC de monitoreo mostró ausencia de glucósidos terpenoides. El eluato resultante, se pasó a través de una columna que consiste de 100 gramos de carbón vegetal activado y 250 gramos de sílica gel del tamaño de malla 60 a 120. Los eluatos resultantes se recolectaron y la columna se lava cuidadosamente con alcohol etílico y todos los lavados se combinaron con el eluato y se concentraron en una instalación de destilación con vacío a 45°C a 50°C, para obtener un polvo. Este polvo se disolvió en 300 ml de Agua desmineralizada, para obtener una solución clara de un contenido de sólidos del 20% y se seca por absorción en un secador por atomización de co-corriente indirecta de aire caliente, bajo las siguientes condiciones.

Temperatura de entrada: 140°C

Temperatura de salida: 80°C

La producción de 30 gm de polvo soluble en agua, de color amarillo pálido con una composición de 40% del asiaticósido, y 36% del madecasósido fue obtenida, por el método HPLC.

### Ejemplo 2

1 kilogramo de la parte aérea que comprende principalmente las hojas y tallos de la planta *Centella asiática*, se toman en una forma limpia y seca, y se pulverizan a un tamaño asegurando que el 100% pase a través, en un molino de martillo de tamaño de malla 20. Este material fue extraído con 5 litros de alcohol etílico, en el extractor contra corriente de lecho fijo repetidamente durante un periodo de 8hrs a 30°C. Después de 8 hrs, el extracto se filtró libre de todos los materiales suspendidos. El filtrado claro se concentró a un semisólido a 40°C, en un rotavapor con vacío. A la masa concentrada se le adicionaron 3 litros de agua desionizada, para obtener un líquido homogéneo. El líquido fue extraído lavándolo dos veces con 2 litros de hexano y la capa acuosa en el fondo se separó. La capa acuosa se extrajo otra vez dos veces con 1 litro de metil isobutil cetona. La capa acuosa en el fondo se separó y se pasó a través de un lecho de resina adsorbente Amberlite XAD1180 (400ml), manteniendo una velocidad de flujo de 25 ml por minuto y el flujo de salida fue monitoreado por la ausencia de centello saponinas.

La columna se lavó cuidadosamente con 5 litros de Agua desmineralizada hasta que los lavados sean incoloros. La columna adsorbente fue eluida con alcohol etílico hasta que la prueba de TLC de monitoreo, mostró ausencia de centello saponinas. El eluato resultante se pasó a través de una columna que consiste de 100 gramos de carbón vegetal activado y 250 gramos de sílica gel del tamaño de malla 60 a 120. El eluato resultante fue recolectado y la columna se lavó cuidadosamente con alcohol isopropílico y todos los lavados se combinaron con el eluato y se concentraron en una instalación de destilación con vacío a 45°C a 50°C, para obtener un polvo. Este polvo se disolvió en 300ml de Agua desmineralizada para obtener una solución clara con un contenido de sólidos de 10% y se seca por absorción en un secador por atomización de co-corriente indirecta de aire caliente, bajo las siguientes condiciones.

Temperatura de entrada: 140°C

Temperatura de salida: 80°C

La producción de 28 gm de polvo soluble en agua, de color amarillo pálido con una composición de 40% de asiaticósido, y 34% de madecasósido fue obtenida por el método HPLC.

### Ejemplo 3

1 kilogramo de la parte aérea, que comprende principalmente las hojas y tallos de la planta *Centella asiática*, se toman en una forma limpia y seca, y se pulverizan a un tamaño asegurando que el 100% pase a través, en un molino de martillo de tamaño de malla 20. Este material fue extraído con 5 litros de alcohol metílico en un extractor contra corriente de lecho fijo, repetidamente durante un periodo de 8hrs a 30°C, después de 8 hrs el extracto se filtró

libre de todos materiales suspendidos. El filtrado claro se concentró a un semisólido a 40°C, en un rotavapor con vacío. A la masa concentrada se le adicionaron 3 litros de agua desionizada, para obtener un líquido homogéneo. El líquido fue extraído lavándolo dos veces con 2 litros de hexano y la capa acuosa en el fondo se separó. La capa acuosa se extrajo de nuevo dos veces con 1 litro de metil isobutil cetona. La capa acuosa en el fondo se separó y se pasó a través de un lecho de resina adsorbente Amberlite XAD1180 (400ml), manteniendo una velocidad de flujo de 25 ml por minuto y el flujo de salida fue monitoreado por la ausencia de centello saponinas.

La columna se lavó cuidadosamente con 5 litros en exceso de Agua desmineralizada, hasta que los lavados sean incoloros. La columna adsorbente fue eluido con alcohol isopropílico hasta que la prueba TLC de monitoreo mostró una ausencia de centello saponinas en el eluato. El eluato resultante se pasó a través de una columna que consiste de 100 gramos de carbón vegetal activado y 250 gramos de silica gel del tamaño de malla 60 a 120. Los eluatos resultantes se recolectaron y la columna se lavó cuidadosamente con alcohol isopropílico y todos los lavados se combinaron con el eluato y se concentraron en una instalación de destilación con vacío a 45°C a 50°C, para obtener un polvo. Este polvo se disolvió en 300 ml de Agua desmineralizada, para obtener una solución clara con un contenido de sólidos del 20% y se seca por absorción en un secador por atomización de co-corriente indirecta de aire caliente bajo las siguientes condiciones.

Temperatura de entrada: 140°C

Temperatura de salida: 80°C

La producción de 32 gm de polvo soluble en agua, de color amarillo pálido, con una composición de 39% asiaticósido, y 34% de madecassósido fue obtenida por el método HPLC.

#### 20 Ejemplo 4

1 kilogramo de la parte aérea que comprende principalmente las hojas y tallos de la planta *Centella asiática*, se toma en una forma limpia y seca, y se pulverizan a un tamaño asegurando que el 100% pase a través, en un molino de martillo de tamaño de malla 20. Este material fue extraído con 5 litros de alcohol metílico en un extractor contra corriente de lecho fijo, repetidamente durante un periodo de 10hrs a 30°C, después de 10 hrs el extracto se filtró libre de todos los materiales suspendidos. El filtrado claro se concentró a un semisólido a 40°C, en un rotavapor con vacío. A la masa concentrada se le adicionaron 3 litros de agua desionizada para obtener un líquido homogéneo. El líquido fue extraído lavándolo dos veces con 2 litros de hexano y la capa acuosa en el fondo se separó. La capa acuosa se extrajo de nuevo, dos veces con 1 litro de metil isobutil cetona. La capa acuosa en el fondo se separó y se pasó a través de un lecho de resina adsorbente Amberlite XAD1180 (400ml), manteniendo una velocidad de flujo de 25 ml por minuto y el flujo de salida fue monitoreado por la ausencia de centello saponinas.

La columna se lavó cuidadosamente con 5 litros en exceso de Agua desmineralizada, hasta que los lavados sean incoloros. La columna adsorbente fue eluida libre con alcohol etílico hasta que la prueba de TLC de monitoreo, mostró ausencia de centello saponinas en el eluato. El eluato resultante se pasó a través de una columna que consiste de 100 gramos de carbón vegetal activado y 250 gramos de silica gel del tamaño de malla 60 a 120. Los eluatos resultantes fueron recolectados y la columna se lavó cuidadosamente con alcohol etílico y todos los lavados se combinaron con eluato y se concentraron en una instalación de destilación con vacío a 45-50°C, para obtener un polvo. Este polvo se disolvió en 300 ml de Agua desmineralizada para obtener una solución clara con un contenido de sólidos del 20% y se seca por absorción en un secador por atomización de co-corriente indirecta de aire caliente bajo las siguientes condiciones.

40 Temperatura de entrada: 140°C

Temperatura de salida: 80°C

La producción de 30 gm de polvo soluble en agua, de color amarillo pálido con una composición de 41% de asiaticósido, y 36% de madecassósido fue obtenida por el método HPLC.

#### Ejemplo 5: Efecto del Compuesto de Prueba en la Suspensión de la Cola en ratones

45 Esta prueba se utiliza para evaluar los potenciales antidepressivos, determinando el porcentaje de disminución en inmovilidad en roedores. La inmovilidad mostrada por los roedores en cautividad cuando se someten a un estrés inevitable es la hipótesis de que reflejan una desesperación en el comportamiento, lo que puede reflejar el estado de la mente de un ser humano que sufre del trastorno depresivo. Los anti-dependientes clínicamente efectivos reducen la inmovilidad que los ratones muestran después de intentos activos y no exitosos de escapar cuando se suspenden por la cola.

50 Procedimiento:

5 Ratonos albinos suizos de ambos sexos que pesaban 25-30 g, serían alojados en jaulas plásticas durante al menos 10 días antes de la prueba. Los animales se dejan adaptar al ambiente de la prueba durante 1 hr antes de la prueba. Grupos de 6 animales serían tratados por vía oral con el fármaco de prueba, el vehículo o el fármaco estándar, 60 minutos antes de la prueba. Para la prueba, los ratones serían suspendidos sobre el borde de un estante de 58 cm por encima de una mesa por cinta adhesiva colocada aproximadamente 1 cm desde la punta de la cola. La duración de inmovilidad se debe registrar durante un periodo de 6 min continuamente. Los ratones se consideran inmóviles cuando cuelgan pasiva y completamente sin movimiento durante al menos 1 min. La imipramina 64mg/kg, p.o. sería utilizada como estándar.

10 El porcentaje de animales que muestran el comportamiento pasivo se cuenta y compara con los controles tratados con vehículo, utilizando varias dosis.

Efecto del Fármaco de Prueba sobre el tiempo de inmovilidad

TRATAMIENTO	TIEMPO DE INMOVILIDAD TOTAL (SEG)	% DISMINUCIÓN EN LA INMOVILIDAD
Vehículo	188.91±7.412	-
Fármaco de Prueba (3mg/kg)	163.27±12.240	13.57
Fármaco de Prueba (10mg/kg)	132.10±8.201 **	30.08
Fármaco de Prueba (30mg/kg)	112.69±10.620 **	40.34
Imipramina (64mg/kg)	90.90±7.690 **	51.88

Los datos representan la media ± SEM (n=8)

\*\*  $P < 0.01$  vs vehículo, datos analizados por ANOVA seguido por la prueba de Dunnett. Los resultados obtenidos en esta prueba mostraron una disminución en la inmovilidad dependiente de la dosis por el fármaco de prueba a dosis de 3, 10 y 30 mg/kg, p.o. A dosis de 10 y 30 mg/kg, la disminución en la inmovilidad fue significativa ( $P < 0.01$ ). El porcentaje de disminución en inmovilidad se calculó contra el grupo de vehículo. El fármaco estándar, imipramina (64mg/kg, p.o.) mostró una disminución en inmovilidad significativa ( $P < 0.01$ ).

**Ejemplo 6: Efecto del Compuesto de Prueba sobre la Actividad locomotora en ratones**

15 Esta prueba se realiza para descartar el aspecto sedante de los anti-depresivos. Además, también puede eliminar ciertos efectos relajantes de los músculos del fármaco. Los ratones albinos suizos se probaron en una cámara locomotora con sensores láser para chequear sus movimientos. La puntuación locomotora es una función directa de la movilidad del animal. La disminución en la movilidad podría ser debida a un efecto sedante y a un efecto relajante muscular.

Procedimiento:

20 Ratonos albinos suizos de ambos sexos que pesan 25-30 g, deberían ser alojados en jaulas plásticas durante al menos 10 días antes de la prueba. Los animales se dejan adaptar al ambiente de la prueba por 1 hr antes de la prueba. Grupos de 6 animales se tratarían con el fármaco de prueba (10, 30 & 100mg/kg, p.o.) o el vehículo o fármaco estándar por vía oral 60 min antes de la prueba. Para la prueba los ratones se colocarían individualmente en Actofotómetro. La actividad locomotora se debería contar por 10 minutos de duración individual. La imipramina 64mg/kg, p.o. se debería utilizar como estándar.

25

Efecto del Fármaco de Prueba en el tiempo de inmovilidad

TRATAMIENTO	RECUENTOS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA TOTAL	% AUMENTO EN LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA
Vehículo	207.50±21.88	

Fármaco de Prueba (3 mg/kg)	220.75±11.25	6.39
Fármaco de Prueba (10 mg/kg)	233.13±15.80	12.35
Fármaco de Prueba (30 mg/kg)	289.38±15.51**	39.46
Imipramina (64 mg/kg)	127.00±06.90**	-38.80
Los datos representan la media ± SEM (n=8)		
** P<0.01 vs vehículo, datos analizados por ANOVA seguido por la prueba de Dunnett		

5 La imipramina es un control positivo y produce la reducción en la actividad locomotora. Esta es una indicación del efecto sedante del fármaco. Mientras que el fármaco de prueba está mostrando un aumento dependiente de la dosis en la actividad locomotora, confirmando así, que no existe un efecto sedante. Es pertinente, registrar que la Imipramina induce sedación. Por consiguiente, el compuesto de prueba no tiene el efecto secundario de sedación como se ve en los fármacos anti-depresivos tricíclicos.

10 El fármaco de prueba, a 30mg/kg, p.o mostró un aumento en la actividad locomotora significativa (P<0.01). A una dosis de 3 y 10 mg/kg, el aumento en la actividad locomotora sin embargo, no fue significativa. El porcentaje de aumento en la actividad locomotora fue calculado contra el grupo de vehículo. El fármaco estándar, la imipramina (64mg/kg, p.o.) mostró un aumento significativo (P<0.01) en la actividad locomotora, pero, que fue menor que el del vehículo y del fármaco de prueba.

#### Ejemplo 7: Prueba de natación forzada

Los ratones obligados a nadar en un espacio restringido del cual no pueden escapar, se inducen a un comportamiento característico de inmovilidad.

#### 15 Procedimiento:

20 Ratones albinos suizos machos que pesan 25-30 g, se llevarían al laboratorio al menos un día antes del experimento y se alojarían por separado en jaulas. Los ratones se ven obligados a nadar de forma individual, dentro de un cilindro vertical de Plexiglás (25 x 23 cm) que contiene 12 cm de agua mantenida a 25°C. Los ratones, colocadas en los cilindros por primera vez son inicialmente muy activos, nadan vigorosamente en círculos, tratando de subir la pared o buceando al fondo.

25 Después de 2-3 min, la actividad comienza a disminuir y se intercala con fases de inmovilidad o flotación de longitud aumentada. Después de 5-6 min la inmovilidad alcanza una meseta donde los ratones permanecen inmóviles durante aproximadamente el 80% del tiempo. Después de 15 min en el agua los ratones se retiran y se dejan secar en una caja caliente (32 °C), antes de que se regresen a sus jaulas de domicilio. Nuevamente se colocan en el cilindro 24 hr después y la duración total de inmovilidad se contará durante los últimos 4 min de 6 min de la sesión de prueba. Un animal se considera que es inmóvil en cualquier momento que permanezca flotando pasivamente en el agua en una posición ligeramente encorvada, pero en posición vertical, su nariz justo encima de la superficie. El fármaco de prueba (10, 30 & 100mg/kg, p.o.) o vehículo o fármaco estándar, Imipramina (100mg/kg, p.o.) se administró una hora antes de la prueba.

#### 30 Efecto del Fármaco de Prueba en el tiempo de inmovilidad

TRATAMIENTO	TIEMPO DE INMOVILIDAD TOTAL(SEG)	% DISMINUCIÓN EN INMOVILIDAD
Vehículo	158.17±8.991	-
Fármaco de Prueba (3 mg/kg)	142.50±3.847	9.90
TRATAMIENTO	TIEMPO DE INMOVILIDAD TOTAL(SEG)	% DISMINUCIÓN EN INMOVILIDAD
Fármaco de Prueba (10 mg/kg)	86.32±15.920 **	45.42

Fármaco de Prueba (30 mg/kg)	49.43±3.584 **	68.75
Imipramina (100 mg/kg)	45.17±4.450 **	71.44
Los datos representan la media ± SEM (n=6)		
** P<0.01 vs vehículo, datos analizados por ANOVA seguido por la prueba de Dunnett		

5 Los resultados obtenidos en esta prueba mostraron que el Fármaco de Prueba produjo una disminución en la inmovilidad dependiente de la dosis a 3, 10 y 30 mg/kg, p.o. A una dosis de 10 y 30 mg/kg, la disminución en inmovilidad fue significativa (P<0.01). El porcentaje de disminución en inmovilidad fue calculado contra el grupo de vehículo. Las lecturas de cada animal se muestran en el apéndice II, página-113. La disminución en inmovilidad mostrada por la dosis de 30mg/kg

#### Antagonismo de la Reserpina

10 El agotamiento de las aminas biogénicas en el cerebro induce no solo a la catalepsia, sino también a la hipotermia en roedores. La disminución de la temperatura corporal inducida por la reserpina es antagonizada por los antidepresivos, inhibidores de MAO y estimulantes centrales. La reserpina también disminuye los niveles de las neuroaminas del cerebro como la serotonina. Por lo tanto, un anti-depresivo debería ser capaz de revertir los efectos de la Reserpina.

#### Ejemplo 8: Prueba de Natación Forzada después de la Administración de la Reserpina

##### Procedimiento:

15 Ratones albinos suizos machos que pesan 25-30g, serían utilizados. Todos los animales serían Pre-entrenados individualmente para nadar durante 15 minutos en un cilindro de plexiglás vertical (25 x 23 cm), que contiene 12 cm de agua conservada a 25°C. Serían inyectados con 5mg/kg de reserpina i.p. después de 20 hr de pre-entrenamiento. Cuatro horas después de la administración de la reserpina, el fármaco de prueba (10, 30 & 100mg/kg) o el vehículo o el fármaco estándar se administró por vía oral. Luego, después de 60 min de tratamiento  
20 los animales serían obligados de forma individual a nadar por 6 min, durante lo cual la inmovilidad se debe registrar. La Imipramina 64mg/kg, p.o. sería utilizada como estándar.

Efecto del Fármaco de Prueba sobre el tiempo de inmovilidad después de la administración de Reserpina

TRATAMIENTO	TIEMPO DE INMOVILIDAD TOTAL(SEG)	% DISMINUCIÓN EN INMOVILIDAD
Vehículo	146.29±12.07	-
Reserpina (5 mg/kg)	221.60±6.793 #	-
Fármaco de Prueba (10 mg/kg)	185.72±10.30	15.99
Fármaco de Prueba (30 mg/kg)	139.92±13.54 **	36.71
Fármaco de Prueba (100 mg/kg)	096.72±7.529 **	56.25
Imipramina (100 mg/kg)	063.57±3.320 **	71.24
Los datos representan la media ± SEM (n=6)		
# P<0.05 vs vehículo, ** P<0.01 vs reserpina, datos analizados por ANOVA seguido por la prueba de Dunnett		

25 Los resultados obtenidos en esta prueba mostraron una disminución en la inmovilidad dependiente de la dosis a dosis de 10, 30 y 100 mg/kg, p.o. del fármaco de prueba. Sin embargo, las dosis de 30 y 100mg/kg mostraron una disminución significativa (P<0.01) en inmovilidad, en comparación con el grupo de reserpina. El porcentaje de

disminución en inmovilidad, fue calculado contra el grupo de reserpina. El fármaco estándar, imipramina (64mg/kg) también mostró una disminución significativa ( $P < 0.01$ ) en la inmovilidad.

**Ejemplo 9: Prueba de Actividad Locomotora después de la Administración de la Reserpina**

5 El agotamiento de aminas biogénicas en el cerebro, induce no solo la catalepsia, ptosis, hipotermia, sino también reduce la actividad locomotora en los roedores. La administración intra-peritoneal de la reserpina (5mg/kg, i.p.) en ratones conduce a reducir la actividad locomotora que puede ser antagonizada por antidepressivos, inhibidores de MAO y estimulantes centrales.

Procedimiento:

10 Ratones albinos suizos machos que pesan 25-30g, serían utilizados. Se administraron con 5mg/kg de Reserpina i.p. Cuatro horas después de la administración de la Reserpina, el fármaco de prueba (10, 30 & 100mg/kg) o el vehículo o el fármaco estándar se administró por vía oral. Luego, después de 60 min de tratamiento, los animales se colocarían de forma individual en un acto-fotómetro por 10 min, durante lo cual, la actividad locomotora se contará. La Imipramina 64mg/kg, p.o. sería utilizada como estándar.

Efecto del Fármaco de Prueba en la actividad locomotora después de la administración de Reserpina

TRATAMIENTO	RECUENTOS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA TOTAL	% AUMENTO EN LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA
Vehículo	280.5±31.79	-
Reserpina (5 mg/kg)	121.17±06.112 ##	-
Fármaco de Prueba (10 mg/kg)	242.33±04.372*	100.00
Fármaco de Prueba (30 mg/kg)	282.17±08.662 ***	132.87
Fármaco de Prueba (100 mg/kg)	214.33±18.33	076.88
Imipramina (64 mg/kg)	218.00±21.48	079.91
Los datos representan la media ± SEM (n=6)		
## P<0.0 vs vehículo, * P<0.05 vs reserpina, *** P<0.001 vs reserpina, datos analizados por la prueba Kruskal-Wallis. Seguido por la prueba de Dunn.		

15 Los resultados obtenidos en esta prueba mostraron un efecto independiente de la dosis de aumento en la actividad locomotora a la dosis de 10, 30 y 100 mg/kg, p.o. del fármaco de prueba. Sin embargo, a una dosis de 10mg/kg ( $P < 0.05$ ) y dosis de 30mg/kg ( $P < 0.001$ ) del fármaco de prueba mostraron una actividad significativa, en comparación con el grupo de reserpina. Los porcentajes de aumento en actividad locomotora fueron calculados contra el grupo de reserpina. El fármaco estándar, imipramina (64mg/kg) no mostró un aumento significativo en la actividad locomotora.

**Ejemplo 10: Potenciación del 5-Hidroxitriptófano (L 5-HTP) en ratones**

Varios agentes antidepressivos potencian los efectos de la serotonina por un bloque de la reabsorción de la serotonina. El 5-Hidroxitriptófano se utiliza como el precursor de la serotonina.

Procedimiento:

25 Grupos de 6 Ratones albinos suizos (25-30 g), serían utilizados. Se tratarían con el fármaco de prueba (10, 30 & 100mg/kg, p.o.) o el vehículo o fármaco estándar 60 min antes de 75mg/kg i.p. de L-5-hidroxitriptófano (5-HTP). Los ratones luego serían colocados en jarras de campana de vidrio y el número de sacudidas de cabeza se contará en cinco intervalos de 2-min (entre 14 y 16, 24 y 26, 34 y 36, 44 y 46 y 54 y 56 min). La Fluoxetina 100mg/kg, p.o. y la imipramina 64mg/kg, p.o. serían utilizadas como estándar.

30 Efecto del Fármaco de Prueba sobre sacudidas de cabeza en la potenciación del 5-HTP

TRATAMIENTO	MEDIA DEL No TOTAL DE SACUDIDAS DE CABEZA $\pm$ SEM	% AUMENTO EN EL No DE SACUDIDAS DE CABEZA
Vehículo	21.625 $\pm$ 1.752	-
Fármaco de Prueba (10 mg/kg)	52.625 $\pm$ 6.050	143.35
Fármaco de Prueba (30 mg/kg)	62.250 $\pm$ 6.239	187.86
Fármaco de Prueba (100 mg/kg)	95.375 $\pm$ 4.617 ***	341.04
Fluoxetina (100 mg/kg)	108.750 $\pm$ 3.702 ***	402.89
Imipramina (64 mg/kg)	13.25 $\pm$ 2.477	-38.73

Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=8)

\*\*\* P<0.001 vs vehículo, datos analizados por Kruskal-Wallis seguido por prueba de comparación múltiple de Dunn

5 Los resultados obtenidos en esta prueba mostraron un aumento significativo (P<0.001) en las sacudidas de cabeza a una dosis de 100 mg/kg, p.o. del fármaco de prueba. El efecto fue dependiente de la dosis. Los porcentajes de aumento en sacudidas de cabeza, fueron calculados contra el grupo de vehículo. El fármaco estándar, fluoxetina (100mg/kg, p.o.) mostró un aumento significativo (P<0.001) en las sacudidas de cabeza, pero, la imipramina (64mg/kg, p.o.) no mostró un aumento significativo en las sacudidas de cabeza.

Se observa que los animales administrados con Fluoxetina tuvieron diarrea y mostraron agitación. Mientras que el grupo de animales del fármaco de prueba no tuvo diarrea y estos animales no estuvieron agitados. El fármaco de prueba es igual de poderoso que la Fluoxetina, sin los usuales efectos secundarios

#### 10 **Ejemplo 11: Efecto del Fármaco de Prueba en la estructura de mucosa gástrica**

6 ratas Wistar fueron tratadas con el fármaco de prueba. El fármaco de prueba fue dosificado a 3 dosis, a saber, : 30, 6, y 120 mg/kg por vía oral. Seis horas después de la administración, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y el estómago fue extraído por disección. Se cortó a lo largo de la curvatura mayor y se lavó con solución salina.

15 La FIG. 1 representa el estómago del animal tratado con una dosis del fármaco de prueba de 30 mg/kg.

La FIG. 2 representa el estómago del animal tratado con una dosis del fármaco de prueba de 60 mg/kg.

La FIG. 3 representa el estómago del animal tratado con una dosis del fármaco de prueba de 120 mg/kg.

20 Estas figuras muestran "crestas" en la parte glandular del estómago. Las crestas aumentan de una forma dependiente de la dosis con el fármaco de prueba. Las dosis del fármaco de Prueba de 60 mg/kg y 120 mg/kg mostraron una formación de crestas más prominente. Estas crestas indican la contractilidad del estómago. Por lo tanto el aumento en la formación de crestas implica un mayor movimiento peristáltico en el estómago. Este movimiento es indicativo de una mayor velocidad de vaciado gástrico.

25 La descripción anterior es ilustrativa de las diferentes modalidades de la invención y no debe interpretarse como una limitación, en el entendimiento de un experto en el oficio, se pueden llevar a cabo muchas variaciones obvias con la presente invención.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para la inhibición de la reabsorción de la serotonina, dicha composición que comprende el asiaticósido a una concentración que oscila entre 15-50% y el madecasósido a una concentración que oscila entre 20-50% opcionalmente junto con excipientes aceptables.
- 5 2. La composición como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el asiaticósido y el madecasósido se obtienen a partir de fuentes vegetales o animales, preferiblemente a partir de la planta *Centella asiática*.
- 10 3. La composición como se reivindica en la reivindicación 1, en donde los excipientes se seleccionan de un grupo que comprende agentes de granulación, agentes de enlace, agentes de lubricación, agentes desintegrantes, agentes edulcorantes, deslizantes, anti-adherentes, agentes antiestáticos, agentes tensoactivos, anti-oxidantes, gomas, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsificantes y agentes de esferonización.
- 15 4. La composición como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicha composición se formula en diversas formas de dosificación seleccionadas de un grupo que comprende comprimidos medicinales, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, unguento, parche, gel, loción, dentífrico, cápsula, emulsión, cremas, aerosol, gotas, polvos o gránulos dispersables, emulsión en cápsulas de gelatina dura o blanda, jarabes, elixires, fitocéuticos, nutraceúticos y productos alimenticios.
- 20 5. Un proceso para la preparación de una composición que comprende el asiaticósido a una concentración que oscila entre 15-50% y el madecasósido a una concentración que oscila entre 20-50%, en donde dicho proceso comprende las etapas de:
- a. filtración y concentración del extracto obtenido de la planta *Centella asiática*;
- b. disolución del extracto concentrado en un solvente para obtener una solución;
- c. tratar la solución con los solventes para eliminar las sustancias grasas, la clorofila y otros colorantes;
- d. pasar la solución tratada a través de un adsorbente en la columna y lavarla con un solvente para obtener el eluato; y
- 25 e. concentración del eluato para obtener la composición.
6. El proceso como se reivindica en la reivindicación 5, en donde el solvente se selecciona de un grupo que comprende compuestos aromáticos heterocíclicos, compuestos alifáticos, cetonas, alcoholes, nitrilos, ésteres, éteres y mezclas de uno o más de estos
- 30 7. El proceso como se reivindica en la reivindicación 5(a), en donde el solvente utilizado para la extracción es preferiblemente un alcohol alifático.
8. El proceso como se reivindica en la reivindicación 5(a), en donde la extracción se lleva a cabo a una temperatura que oscila entre 20°C y 38°C, preferiblemente a 30°C.
9. El proceso como se reivindica en la reivindicación 5(a), en donde la extracción se lleva a cabo durante 6h a 10h, preferiblemente durante 8h.
- 35 10. El proceso como se reivindica en la reivindicación 5(a), en donde la concentración se lleva a cabo a una temperatura que oscila entre 40°C y 50°C, preferiblemente a 45°C.
11. El proceso como se reivindica en la reivindicación 5(b), en donde el solvente es preferiblemente agua desionizada.
- 40 12. El proceso como se reivindica en la reivindicación 5(c), en donde el solvente se selecciona de un grupo que comprende hexano, éter de petróleo y metilisobutilcetona.
13. El proceso como se reivindica en la reivindicación 5(d), en donde el adsorbente se selecciona de un grupo que comprende resina, carbón vegetal, silica gel y una mezcla de estos.
14. El proceso como se reivindica en la reivindicación 5(e), en donde la concentración se lleva a cabo a una temperatura que oscila entre 50°C y 65°C.

**15.** Uso de una composición, que comprende el asiaticósido a una concentración que oscila entre 15-50% y el madecasósido a una concentración que oscila entre 20-50% opcionalmente junto con excipientes, para fabricar un medicamento para el tratamiento de trastornos mediados por la serotonina en un sujeto que lo necesite.

**16.** El uso como se reivindica en la reivindicación 15, en donde el sujeto es un animal o ser humano.

5 **17.** El uso como se reivindica en la reivindicación 15, en donde la composición se administra a una dosificación que oscila entre 15-150mg/kg de peso corporal en animales y 1-15mg/kg de peso corporal en seres humanos.

**18.** El uso como se reivindica en la reivindicación 15, en donde los trastornos mediados por la serotonina son la depresión, la obesidad, el vaciado gástrico, elevación del estado de ánimo y otros trastornos que implican a la serotonina.

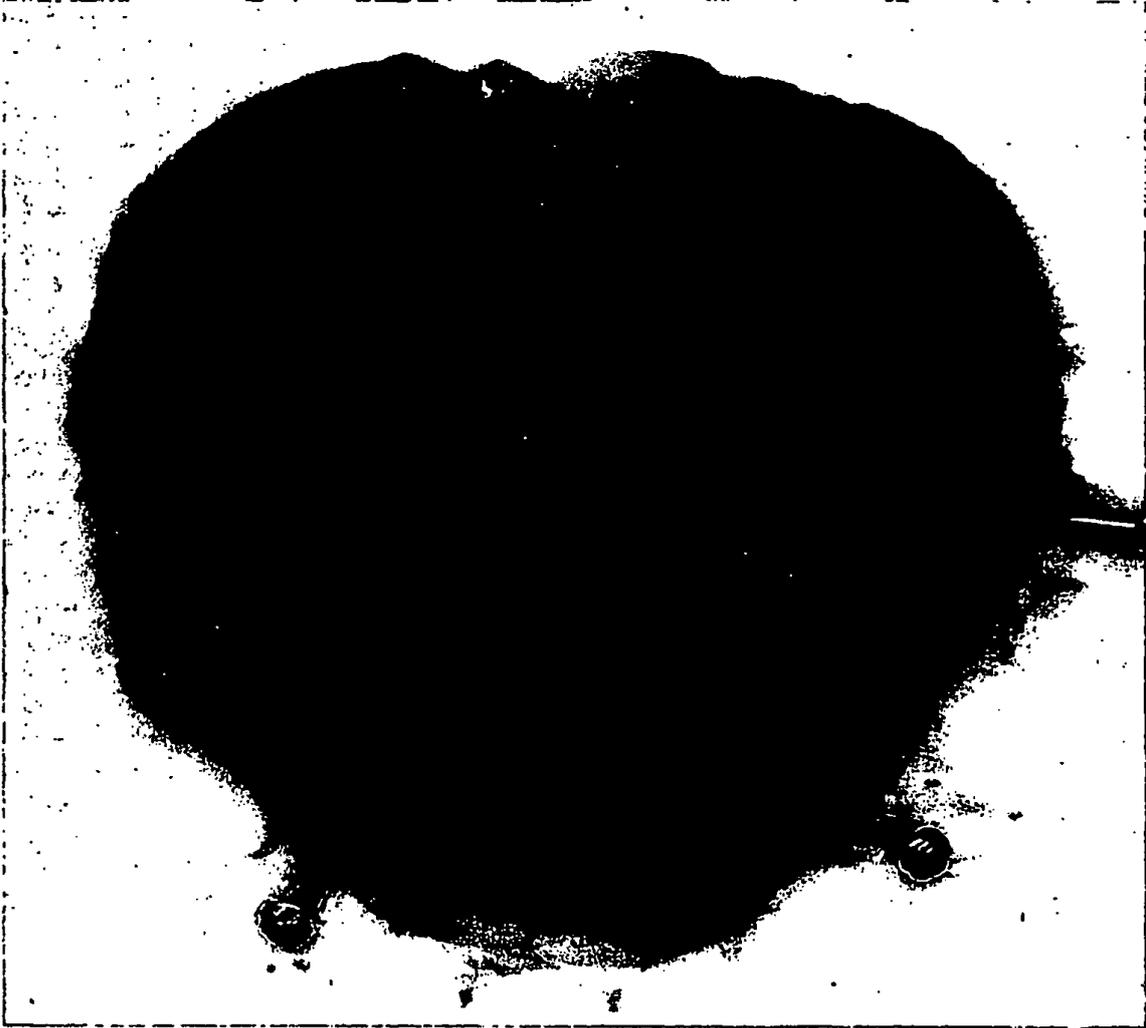
10 **19.** El uso como se reivindica en la reivindicación 15, en donde la composición es no-tóxica y libre de efectos adversos.

15

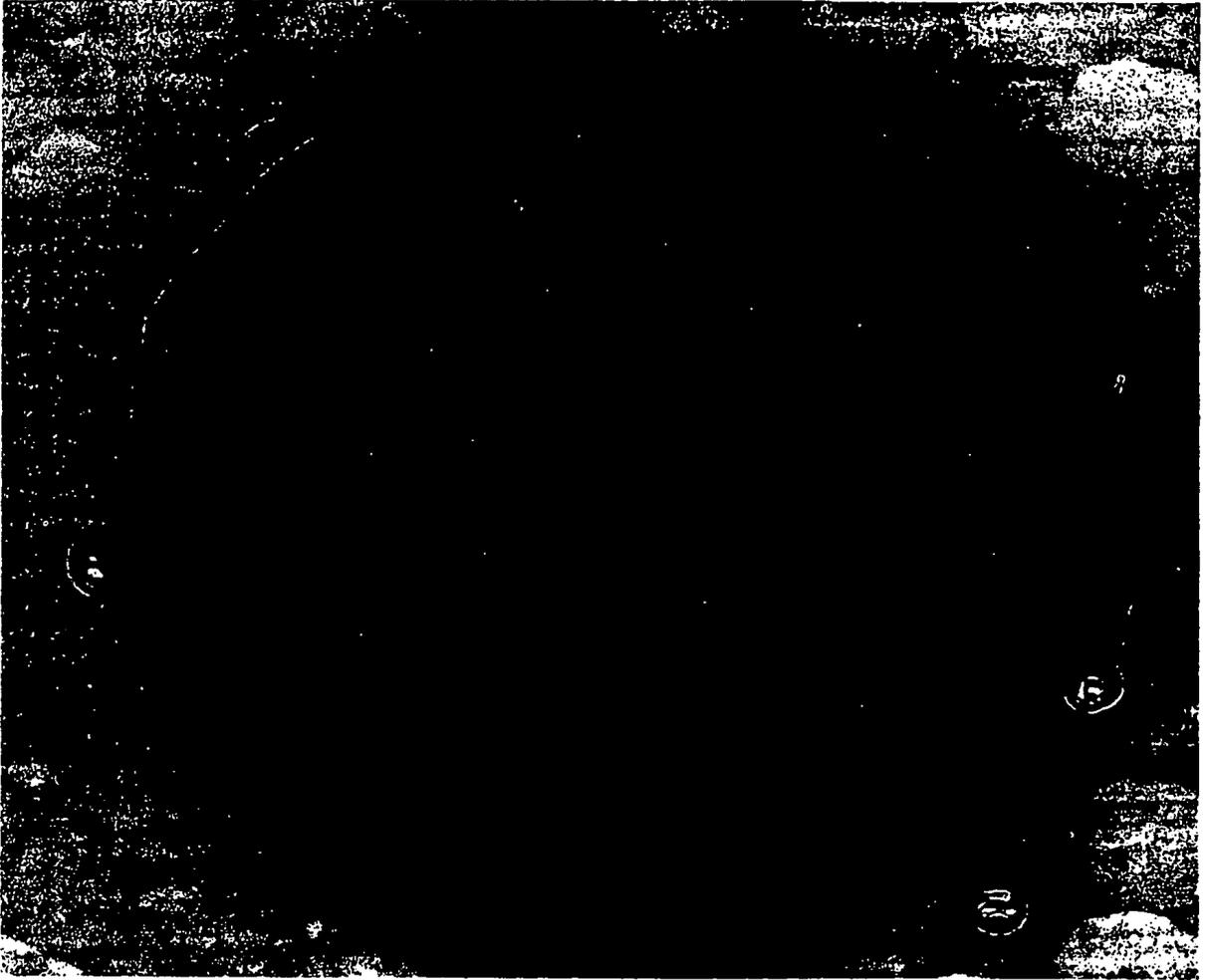
20

25

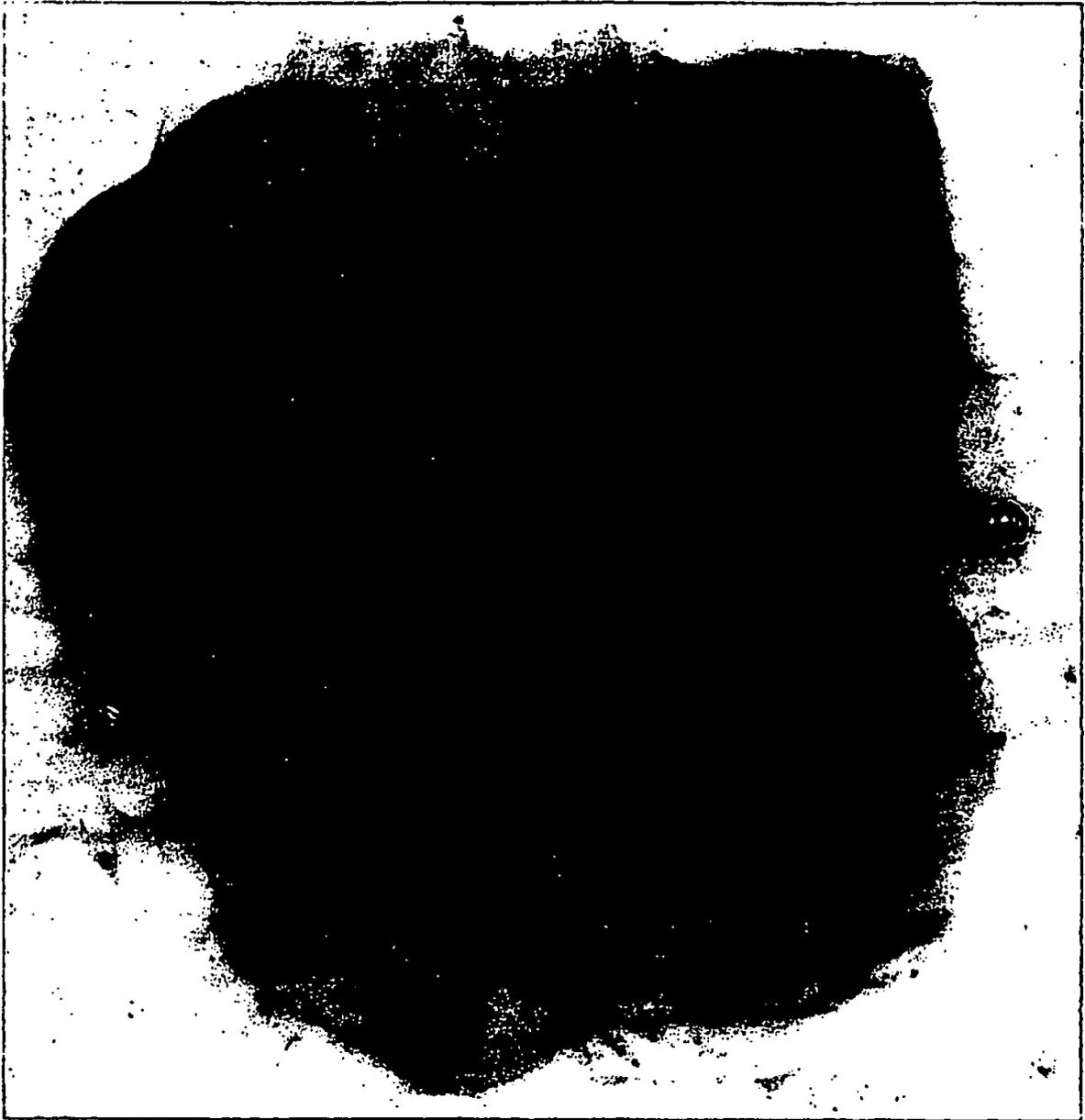
30



**Figura: 1**



**Figura: 2**



**Figura: 3**

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION**

5 *Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.*

**Documentos de patentes citadas en la descripción**

- CN 1583127 A [0010]
- CN 1709401 A [0011]
- EP 0383171 A2 [0013]

10 **Literatura no-patente citada en la descripción**

- **Brinkhaus, B. et al.** *Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant Centella asiatica* [0012]