

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 330**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/704** (2006.01)

**A61K 36/23** (2006.01)

**A61P 25/02** (2006.01)

**A61P 25/06** (2006.01)

**A61P 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2011 PCT/IB2011/053148**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12164356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2011 E 11866850 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2714051**

54 Título: **Un método para el tratamiento de la hipercortisolemia, trastornos de cefalea, dolor neuropático y trastornos relacionados**

30 Prioridad:

**02.06.2011 IN MM16332011**

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

**13.03.2017**

73 Titular/es:

**INDUS BIOTECH PRIVATE LIMITED (100.0%)  
1 Rahul Residency Plot No.6 & 7, Off Salunke  
Vihar Road, Kondhwa  
Pune 411 048, Maharashtra, IN**

72 Inventor/es:

**BHASKARAN, SUNIL y  
VISHWARAMAN, MOHAN**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

ES 2 605 330 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

Un método para el tratamiento de la hipercortisolemia, trastornos de cefalea, dolor neuropático y trastornos relacionados

5

### Campo técnico

La presente divulgación se refiere al tratamiento y gestión de la hipercortisolemia, trastornos de cefalea y dolor neuropático usando una composición que comprende asiaticósido y madecasósido opcionalmente junto con al menos un excipiente.

10

### Antecedentes y técnica anterior

La serotonina es un neurotransmisor implicado en numerosas funciones cerebrales. Los receptores de serotonina conocidos habitualmente como receptores de 5-hidroxitriptamina (5-HT) se expresan extensamente en diversos sitios del cuerpo tales como el cerebro, los vasos sanguíneos, las válvulas cardíacas, el tracto gastrointestinal, las plaquetas, etc. La unión de la serotonina a los receptores de 5-HT puede inducir tanto neurotransmisión inhibitoria como excitatoria. Hay catorce receptores de 5-HT identificados. La serotonina es capaz de ejercer efectos cardiovasculares complejos, que incluyen hipotensión o hipertensión, vasodilatación o vasoconstricción, bradicardia o taquicardia, etc. La acción ejercida por la serotonina depende de la naturaleza del receptor de 5-HT al que se une, junto con la sensibilidad y la densidad del receptor. Los receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>1D</sub> se expresan en los vasos sanguíneos y en el sistema nervioso central. La unión de la serotonina a estos receptores causa vasoconstricción en los vasos sanguíneos. Los fármacos que se unen a los receptores de 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>1D</sub> se usan en el tratamiento de la migraña. Sin embargo, puesto que los receptores de 5-HT<sub>1B</sub> se expresan también en

15

20

25

30

válvulas cardíacas, la administración a largo plazo de estos fármacos puede causar enfermedades cardiovasculares. Análogamente, aparte de la vasoconstricción, los receptores de 5-HT<sub>1A</sub> están implicados también en la transducción de la señal nociceptiva. Un agonista del receptor de 5-HT<sub>1A</sub> puede reducir la percepción del dolor hasta un nivel significativo de casi un 80 % en comparación con fármacos opioides convencionales. Por tanto, es evidente que el efecto aguas abajo de la serotonina varía dependiendo del tipo de receptor de 5-HT al que se une.

35

La clasificación internacional de los trastornos de cefalea (2ª edición) describe la migraña como un trastorno neurovascular caracterizado por una cefalea unilateral severa y pulsátil asociado a la anorexia, náuseas, vómitos, fotofobia y/o fonofobia. Los tipos más comunes de migraña son: (i) migraña con aura que se inicia con síntomas viscerales, sensoriales o motores seguidos de una cefalea; y (ii) migraña sin aura - la cefalea es similar a la de (i) pero no va precedida por el aura.

Existen muchas teorías para describir la etiología de la migraña. La teoría vascular expone que las cefaleas migrañosas resultan de la dilatación de los vasos sanguíneos que es causada por la liberación de sustancias vasodilatadoras tales como neuropéptidos, neuroquininas, etc. Por lo general se acepta que este síndrome neurovascular es causado principalmente por la activación del sistema trigeminovascular. Ciertas estructuras del cerebro que posiblemente estén implicadas en la migraña se han identificado tal como sigue: la arteria meníngea rodeada por mastocitos en las meninges; las arterias cerebrales grandes; el nervio trigémino de las arterias meníngeas y las arterias cerebrales; y el nervio trigémino que conecta los ganglios trigéminos con el núcleo caudado trigeminal (TNC). El TNC conduce las señales nociceptivas a los centros superiores del dolor en el tálamo y la corteza cerebral. La activación de los nervios trigéminos puede causar la liberación de varios neuropéptidos, que incluyen el péptido relacionado con el gen de la calcitonina en las terminaciones nerviosas sensoriales. Esto genera una patofisiología vascular que lleva a la neuroinflamación.

40

45

La teoría de la serotonina es en realidad una amplia exposición que confirma el papel del aumento de la serotonina y el 5-HIAA durante el ataque de migraña. Se ha informado que los pacientes con migraña muestran un aumento de la síntesis de la serotonina en el cerebro en comparación con sujetos normales. Esto puede llevar a una hiperexcitabilidad cortical. De manera interesante, también se ha comunicado que la migraña es un síndrome de serotonina baja. Por tanto, la implicación de la serotonina en la migraña no es concluyente. Otras hipótesis avalan el papel que las hormonas y los cambios en la anatomía desempeñan en el desarrollo de la migraña. Por tanto, la patofisiología de la migraña es muy compleja y no se comprende con total claridad.

50

55

Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) son una clase de compuestos que se usan normalmente en el tratamiento de trastornos de depresión y ansiedad. Estos aumentan la concentración extracelular del neurotransmisor serotonina mediante la inhibición de su recaptación en las neuronas presinápticas y el aumento de la serotonina disponible en la hendidura sináptica para unirse al receptor postsináptico. Existe una noción mal entendida de que todos los ISRS son fármacos útiles para la migraña. Esto no es cierto, ya que mayores niveles de serotonina pueden unirse a los 14 receptores de 5-HT con igual afinidad y muchos de estos están contraindicados para la migraña. Asimismo, hay dudas sobre la expresión de muchas de las proteínas receptoras de 5-HT que están relacionadas con otras afecciones del SNC. Por ejemplo, se ha comunicado que los receptores de 5-HT<sub>1A</sub> no se sintetizan en el SNC en el caso de altos niveles de neuroesteroides.

60

65

Lampl et al. (2010), en su artículo sobre antidepresivos para la profilaxis de la migraña publicado en el *European Neurological Journal*, han analizado críticamente los datos publicados sobre la eficacia de los ISRS para la migraña y han concluido que los efectos beneficiosos de los ISRS son equivalentes a los observados en el grupo placebo tras una terapia crónica. Esto demuestra que los ISRS no son en general necesariamente útiles para la migraña. La comprensión de la selectividad de una molécula por los subtipos del receptor de 5-HT es crucial para determinar su implicación en el tratamiento de la migraña.

Basándose en la definición de migraña y su conocida patofisiología, es evidente que un fármaco antimigraña ideal debería inhibir la vasodilatación (o causar la vasoconstricción) y reducir la percepción del dolor o nocicepción. Estas dos acciones directas de un fármaco proporcionarían un alivio potencial de los síntomas relacionados con la migraña. Los receptores de 5-HT<sub>1A</sub> aparecen como una diana ideal para conseguir esta acción dual. Los agonistas selectivos de los receptores de 5-HT<sub>1A</sub> tienen la capacidad de ofrecer una terapia antimigraña mejor que el tratamiento convencional actual de la migraña, concretamente la clase de fármacos triptanes.

El dolor neuropático es otra afección patológica de dolor caracterizada por dolor neurálgico persistente, independiente de la estimulación sensorial, junto con hipersensibilidad en el sitio del dolor. Está asociado a muchas enfermedades tales como diabetes, alcoholismo, vasculitis, polineuropatía idiopática, lesión de la médula espinal, cáncer, apoplejía, VIH, enfermedades neurológicas degenerativas, síndrome de Guillain Barré, neuralgia postherpética y neuralgia del trigémino. El dolor neuropático está causado por una lesión o una disfunción del sistema nervioso central o periférico que da lugar a síntomas de pérdida de sensación, parestesia y dolor.

El dolor neuropático no es un síndrome aislado. Es una manifestación de una variedad de mecanismos subyacentes incluyendo los impulsos ectópicos del neuroma, los cambios en los canales del sodio y del calcio en los nervios afectados, la activación simpática y una deficiente vía inhibitoria central que son algunos de los mecanismos patológicos.

Actualmente, no existe un tratamiento que pueda prevenir el dolor neuropático. Los pacientes que padecen dolor neuropático no responden a los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los antidepresivos y anticonvulsivos son el tratamiento convencional prescrito para el alivio del dolor. Estos fármacos, sin embargo, tienen una ineficacia incompleta y graves efectos secundarios. El mecanismo de acción de los antidepresivos en el tratamiento del dolor neuropático no se comprende completamente. Saarto et al. (2010), en su revisión de los antidepresivos para el dolor neuropático publicada en *The Cochrane Library*, mostraban que solo aproximadamente un tercio de los pacientes que usan antidepresivos presentan un alivio del dolor neuropático y aproximadamente un quinto de los pacientes dejaban el tratamiento debido a los graves efectos secundarios. Basándose en la evidencia existente de ensayos clínicos publicados, los fármacos ISRS no son eficaces en el tratamiento del dolor neuropático, aunque los antidepresivos tricíclicos son más eficaces en cuanto a proporcionar un alivio del dolor clínicamente significativo. La actividad de los agonistas de los receptores de 5-HT<sub>1A</sub> en la reducción de la percepción del dolor puede tener capacidad en tratamiento del dolor neuropático.

Meijer et al. (1994, *Eur J Pharmacol.*, Vol. 266, N.º 3, págs. 255-61), demostraron que la exposición prolongada de células de hipocampo de rata a neuroesteroides tales como la corticosterona inhibían la expresión del ARNm de los receptores de 5-HT<sub>1A</sub>. En condiciones de estrés en seres humanos, un exceso de la secreción de neuroesteroides puede regular negativamente la expresión de los receptores de 5-HT<sub>1A</sub> lo que, a su vez, aumenta la sensibilidad al dolor. Esto explica la migraña o dolor crónico que sufren los pacientes que padecen trastornos depresivos. La exposición prolongada de los tejidos corporales a altos niveles del neuroesteroide cortisol tiene como resultado un trastorno conocido como síndrome de Cushing o hipercortisolismo. El síndrome de Cushing puede ser inducido por la administración exógena a largo plazo de hormonas esteroideas tales como glucocorticoides, hormona adrenocorticotrófica (ACTH), píldoras anticonceptivas que contienen hormonas estrógenas y por otras anomalías endógenas en el cuerpo. Los síntomas del síndrome de Cushing incluyen uno o más de los siguientes: diabetes, hipertensión, obesidad de la parte superior del cuerpo, aumento de la deposición de grasa alrededor del cuello, cara redondeada, adelgazamiento de brazos y piernas, fatiga severa, debilidad muscular, etc. Irritabilidad, ansiedad, disfunciones cognitivas y depresión son síntomas conductuales comunes asociados al síndrome de Cushing. El tratamiento del síndrome de Cushing incluye la administración de fármacos que inhiben el cortisol tal como el ketoconazol y la metirapona junto con fármacos para el tratamiento de los síntomas.

La presente divulgación se refiere al tratamiento y gestión del síndrome de Cushing, la migraña, el dolor neuropático, la migraña y dolores relacionados. Estos son trastornos neurológicos que requieren terapias de tratamiento a largo plazo. La presente divulgación se dirige al uso de una composición botánicamente derivada que comprende un 15-50 % de asiaticósido y un 20-50 % de madecasósido opcionalmente junto a otros excipientes, como una opción de tratamiento eficaz y seguro para la administración crónica en pacientes que padecen estas enfermedades.

Bhaskaran et al. (US20080194499) divulga una composición para la inhibición de la recaptación de serotonina que comprende un 15-50 % de asiaticósido y un 20-50 % de madecasósido. Este documento muestra que la composición es útil en el tratamiento de enfermedades que están mediadas por la reducción de los niveles de serotonina, concretamente la depresión, la elevación del estado de ánimo, el vaciado gástrico, etc., mediante el aumento de los niveles del neurotransmisor serotonina. Este documento enseña que la composición potencia los efectos de la serotonina bloqueando la recaptación de serotonina. Sin embargo, no existe una sugerencia o claridad

en la solicitud de esta composición en cuanto a abordar los efectos de la percepción nociceptiva y del dolor neuropático, la atenuación de la vasodilatación y la modulación de la hipersecreción de neuroesteroides. Esta solicitud tampoco enseña nada acerca de la reducción de los síntomas asociados al síndrome de Cushing (hipercortisolemia). Esta solicitud habla sobre el aumento de la concentración de serotonina mediante la reducción de su recaptación en los receptores presinápticos.

### Exposición de la divulgación

La invención se refiere a una composición que consiste en asiaticósido y madecasósido, opcionalmente junto con al menos un excipiente para su uso en el tratamiento de una afección patológica seleccionada entre un grupo que comprende hipercortisolemia, trastorno de cefalea y dolor neuropático o cualquier combinación de afecciones de las mismas.

De acuerdo con esto, la presente divulgación se refiere a un método para el tratamiento de una afección patológica seleccionada entre un grupo que comprende hipercortisolemia, trastorno de cefalea y dolor neuropático o cualquier combinación de afecciones de las mismas, comprendiendo dicho método administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que comprende asiaticósido y madecasósido, opcionalmente junto con al menos un excipiente, a un sujeto que necesite la misma.

### Descripción detallada de la divulgación

La presente divulgación se refiere a un método para el tratamiento de una afección patológica seleccionada entre un grupo que comprende hipercortisolemia, trastorno de cefalea y dolor neuropático o cualquier combinación de afecciones de las mismas, comprendiendo dicho método administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que comprende asiaticósido y madecasósido, opcionalmente junto con al menos un excipiente, a un sujeto que necesite la misma.

En una realización de la presente divulgación, el asiaticósido está en una concentración que varía de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 50 % y el madecasósido está en una concentración que varía de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 50 %.

En otra realización de la presente divulgación, la composición se obtiene de la planta *Centella asiatica*.

En otra realización adicional de la presente divulgación, la afección de hipercortisolemia es el síndrome de Cushing.

En otra realización adicional de la presente divulgación, la afección de trastorno de cefalea se selecciona entre un grupo que comprende migraña, cefalea tensional y cefalea en racimos o cualquier combinación de las mismas.

En otra realización adicional de la presente divulgación, la composición se administra en una dosis que varía de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el sujeto es un animal o un ser humano.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el excipiente se selecciona entre un grupo que comprende agentes de granulación, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes disgregantes, agentes edulcorantes, sustancias de deslizamiento, agentes antiadherentes, agentes antiestáticos, tensioactivos, antioxidantes, gomas, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, material celulósico vegetal, y agentes de esferonización o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización adicional de la presente divulgación, la composición se formula en formas farmacéuticas seleccionadas entre un grupo que comprende comprimidos, grageas, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, ungüentos, parches, geles, lociones, dentífricos, cápsulas, emulsiones, cremas, pulverizaciones, gotas, gránulos o polvos dispersables, emulsiones en cápsulas de gel duras o blandas, jarabes, elixires, fitocéuticos, nutracéuticos y productos alimentarios o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización de la presente divulgación, la composición media en la nocicepción, la vasoconstricción y la modulación de la secreción de neuroesteroides.

En otra realización adicional de la presente divulgación, la composición se une selectivamente al receptor de 5-HT1A.

En otra realización adicional de la presente divulgación, la composición se administra en un intervalo de dosificación de 1-100 mg/kg en animales y 1-50 mg/kg en seres humanos al día.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el proceso de preparación de una composición que comprende asiaticósido y madecásido comprende las siguientes etapas:

- 5 a. obtener un extracto de la planta *Centella asiatica*;
- b. filtrar y concentrar el extracto;
- c. disolver el extracto concentrado en un disolvente para obtener una solución;
- d. tratar la solución con los disolventes para eliminar sustancias grasas,
- e. clorofila y otros colorantes;
- 10 f. pasar la solución tratada a través de adsorbentes para obtener una solución transparente; y
- g. concentrar la solución transparente para obtener la composición.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el disolvente se selecciona entre un grupo que comprende compuestos aromáticos heterocíclicos, compuestos alifáticos, cetonas, alcoholes, nitrilos, ésteres, éteres y mezclas de uno o más de los mismos.

15 En otra realización adicional de la presente divulgación, el disolvente usado para la extracción es preferentemente un alcohol alifático.

20 En otra realización adicional de la presente divulgación, la extracción se lleva a cabo a una temperatura que varía de 20 °C a 38 °C, preferentemente a 30 °C.

En otra realización adicional de la presente divulgación, la extracción se lleva a cabo durante un periodo de 6 h a 10 h, preferentemente durante 8 h.

25 En otra realización adicional de la presente divulgación, la concentración se lleva a cabo a una temperatura que varía de 40 °C a 50 °C, preferentemente a 45 °C.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el disolvente es preferentemente agua desionizada.

30 En otra realización adicional de la presente divulgación, el disolvente se selecciona entre un grupo que comprende hexano, éter de petróleo, y metil isobutil cetona.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el adsorbente se selecciona entre un grupo que comprende resina, carbón vegetal, gel de sílice y una mezcla de los mismos.

35 En otra realización adicional de la presente divulgación, la concentración se lleva a cabo a una temperatura que varía de 50 °C a 65 °C.

40 La presente divulgación se refiere también a la fabricación de un medicamento compuesto por asiaticósido y madecásido, opcionalmente junto con excipientes, para el síndrome de Cushing, la migraña, el dolor neuropático y la mialgia.

45 En otra realización adicional de la presente divulgación, el excipiente se selecciona entre un grupo que comprende agentes de granulación, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes disgregantes, agentes edulcorantes, sustancias de deslizamiento, agentes antiadherentes, agentes antiestáticos, tensioactivos, antioxidantes, gomas, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes de esferonización y material celulósico vegetal.

50 En otra realización adicional de la presente divulgación, dicha composición se formula en diversas formas farmacéuticas seleccionadas entre un grupo que comprende comprimidos, grageas, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, ungüentos, parches, geles, lociones, dentífricos, cápsulas, emulsiones, cremas, pulverizaciones, gotas, gránulos o polvos dispersables, emulsiones en cápsulas de gel duras o blandas, jarabes, elixires, linimentos, pomadas, parches cutáneos, pulverizaciones nasales, fitocéuticos, nutracéuticos y productos alimentarios.

55 En otra realización de la presente divulgación, se sobreentiende que la composición puede comprender material celulósico de semillas de *Centella asiatica* en pequeñas proporciones.

60 La divulgación se explica adicionalmente con más detalle con la ayuda de los siguientes ejemplos. Sin embargo, no se debe interpretar que estos ejemplos limitan el alcance de la divulgación.

### Ejemplo 1

65 Se recoge 1 kilogramo de la parte aérea que comprende concretamente las hojas y los tallos de la planta *Centella asiatica* en forma seca y limpia, y se pulveriza hasta un tamaño que asegure el paso del 100 % a través de un

molino de martillos de 20 mallas. Este material se extrajo con 5 litros de alcohol metílico en un extractor de lecho fijo a contracorriente repetidamente a lo largo de un periodo de 10 h a 30 °C. Al cabo de 10 h, el extracto se limpió mediante filtración de todas las materias suspendidas. El filtrado transparente se concentró hasta un semisólido a 40 en un evaporador rotatorio al vacío. A la masa concentrada se añaden 3 litros de agua desionizada hasta conseguir un líquido homogéneo. El líquido se extrajo mediante lavado del mismo dos veces con 2 litros de hexano y la capa acuosa inferior se separó. La capa acuosa se extrajo de nuevo dos veces con 1 litro de metil isobutil cetona. La capa acuosa inferior se separó y se hizo pasar a través de un lecho de resina adsorbente Amberlite XAD1180 (400 ml) manteniendo una velocidad de flujo de 25 ml por minuto y el efluente se controló para determinar la ausencia de saponinas de centella.

La columna se lavó minuciosamente con 5 litros en exceso de agua desmineralizada hasta que los líquidos de lavado eran incoloros. La columna de adsorbente se eluyó libremente con alcohol etílico hasta que el ensayo de control de TCL (cromatografía de capa fina) mostró la ausencia de saponinas de centella en el eluido. El eluido resultante se hizo pasar a través de una columna que comprendía 100 gramos de carbón vegetal activado y 250 gramos de gel de sílice con un tamaño de 60 a 120 mallas. Los eluidos resultantes se recogieron y la columna se lavó minuciosamente con alcohol etílico y todos los líquidos de lavado se combinaron con el eluido y se concentraron en una instalación de destilación al vacío a 45-50 hasta obtener un polvo. Este polvo se disolvió en 300 ml de agua desmineralizada hasta conseguir una solución transparente con un contenido en sólidos del 20 % y se secó por pulverización en un secador de pulverización de aire caliente indirecto a contracorriente en las siguientes condiciones: temperatura de entrada: 140 °C y temperatura de salida: 80 °C. Mediante el método de HPLC se obtuvo un rendimiento de 30 g de un polvo amarillo pálido soluble en agua con una composición de un 41 % de asiaticósido y un 36 % de madecasósido.

#### Ejemplo 2:

Se recoge 1 kilogramo de la parte aérea que comprende concretamente las hojas y los tallos de la planta *Centella asiatica* en forma seca y limpia, y se pulveriza hasta un tamaño que asegure el paso del 100 % a través de un molino de martillos de 20 mallas. Este material se extrajo con 5 litros de alcohol metílico en un extractor de lecho fijo a contracorriente repetidamente a lo largo de un periodo de 8 h a 30 °C. Al cabo de 8 h el extracto se limpió mediante filtración de todas las materias suspendidas. El filtrado transparente se concentró hasta un semisólido a 40 en un evaporador rotatorio al vacío. A la masa concentrada se añaden 3 litros de agua desionizada hasta conseguir un líquido homogéneo. El líquido se extrajo mediante lavado del mismo dos veces con 2 litros de hexano y la capa acuosa inferior se separó. La capa acuosa se extrajo de nuevo dos veces con 1 litro de metil isobutil cetona. La capa acuosa inferior se separó y se hizo pasar a través de un lecho de resina adsorbente Amberlite XAD1180 (400 ml) manteniendo una velocidad de flujo de 25 ml por minuto y el efluente se controló para determinar la ausencia de saponinas de centella.

La columna se lavó minuciosamente con 5 litros en exceso de agua desmineralizada hasta que los líquidos de lavado eran incoloros. La columna de adsorbente se eluyó libremente con alcohol isopropílico hasta que el ensayo de control de TCL mostró la ausencia de saponinas de centella en el eluido. El eluido resultante se hizo pasar a través de una columna que comprendía 100 gramos de carbón vegetal activado y 250 gramos de gel de sílice con un tamaño de 60 a 120 mallas. Los eluidos resultantes se recogieron y la columna se lavó minuciosamente con alcohol isopropílico y todos los líquidos de lavado se combinaron con el eluido y se concentraron en una instalación de destilación al vacío a 45-50 hasta obtener un polvo. Este polvo se disolvió en 300 ml de agua desmineralizada hasta conseguir una solución transparente con un contenido en sólidos del 20 % y se secó por pulverización en un secador de pulverización de aire caliente indirecto a contracorriente en las siguientes condiciones: temperatura de entrada: 140 °C y temperatura de salida: 80 °C. Mediante el método de HPLC se obtuvo un rendimiento de 32 g de un polvo amarillo pálido soluble en agua con una composición de un 39 % de asiaticósido y un 34 % de madecasósido.

#### Ejemplo 3:

Se mezclaron 10 g de la composición de un 41 % de asiaticósido y un 36 % de madecasósido del ejemplo 1 con 1 g de asiaticósido 99 % puro hasta llegar a una composición que comprende 11 g de 46,3 % de asiaticósido y un 32,7 % de madecasósido. Este ejemplo demuestra un método para llegar al intervalo de composición deseado que comprende un 15-50 % de asiaticósido y un 20-15 % de madecasósido mezclando diferentes composiciones que tienen concentraciones variadas de asiaticósido y madecasósido. El experto en la materia ha de entender que la composición obtenida en el presente documento se puede conseguir mezclando los componentes, asiaticósido y madecasósido, disponibles bien mediante extracción a partir de fuentes vegetales o bien obtenidos mediante síntesis química de dichos componentes.

La composición de ensayo que comprende un 15-50 % de asiaticósido y un 20-50 % de madecasósido se ensayó posteriormente para determinar su actividad fisiológica en los siguientes ejemplos:

**Ejemplo 4: Actividad de la composición de ensayo en ratas sometidas a bulbectomía olfatoria**

La bulbectomía olfatoria bilateral (OBX) es un modelo animal de depresión crónica que demuestra el papel fundamental del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) en el mantenimiento de la homeostasis. La OBX induce alteraciones en el eje HPA y lleva consigo cambios conductuales y fisiológicos que indican depresión crónica en el animal. Tras la recuperación de la cirugía, los animales con OBX mostraron un aumento drástico de su peso corporal. Esta ganancia de peso iba acompañada de otros cambios fisiológicos característicos tales como un aumento del consumo de comida, inicio de depresión, concentración de sodio y niveles de corticosterona elevados. Se descubrió que estos síntomas estaban asociados al síndrome de Cushing. Era interesante observar que el modelo OBX simula las afecciones del síndrome de Cushing.

El síndrome de Cushing está asociado a afecciones de sobrepeso, resistencia a la insulina, depresión, aumento del consumo de comida y aumento de la secreción de cortisol. A fin de estudiar la actividad de la composición de ensayo que comprende un 39 % de asiaticósido y un 34 % de madecasósido, los presentes inventores usaron el modelo animal de ratas sometidas a bulbectomía olfatoria bilateral (OBX) que produce todos los síntomas anteriores observados en el síndrome de Cushing.

**Procedimiento:** Se anestesiaron ratas Wistar macho con ketamina (80 mg/kg) y los bulbos olfatorios se aspiraron quirúrgicamente mediante una aguja hipodérmica roma unida a una bomba de agua sin dañar el lóbulo frontal. Los animales se dejaron en recuperación tras la cirugía durante un periodo de 2 semanas. El tratamiento crónico con la composición de ensayo se llevó a cabo durante 14 días. Se efectuaron ensayos conductuales colocando los animales en un campo abierto y observando las puntuaciones de deambulación, postura erguida, y acicalamiento durante un periodo de 5 minutos. La puntuación de la deambulación se midió como el número medio de cuadrados cruzados en 3 minutos. La puntuación de la postura erguida se midió como el número de actividades de postura erguida en 3 minutos. La puntuación del acicalamiento se midió como el número de actividades de acicalamiento en 3 minutos. El último día de tratamiento, se tomaron muestras de sangre para medir la corticosterona sérica. La corticosterona es el glucocorticoide dominante encontrado en roedores y es equivalente a la hormona cortisol encontrada en seres humanos.

**Resultados:** Los animales con OBX demostraron un aumento del 21,28 % del peso corporal en comparación con la ganancia de peso normal del 7,9 % observada en el grupo de control de la simulación. La composición de ensayo inhibía significativamente el aumento de peso corporal inducido por la OBX en un 12 %, un 16,88 % y un 18,56 % a dosis de 3, 10 y 30 mg/kg.

35 TABLA 1: EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE ENSAYO SOBRE EL PESO CORPORAL DE RATAS SOMETIDAS A BULBECTOMÍA OLFATORIA (EN GRAMOS)

Tiempo	Control de la Simulación	Control de la OBX	OBX + Composición de ensayo (3 mg/kg)	OBX + Composición de ensayo (10 mg/kg)	OBX + Composición de ensayo (30 mg/kg)
Antes de la cirugía (Día -14)	251,2 ± 16,10	268,8 ± 12,60	273,8 ± 16,27	268,0 ± 13,76	286,6 ± 9,36
Después de 14 días de recuperación de la cirugía (Día 0)	255,4 ± 16,25	315,4 ± 13,46 <sup>###</sup>	302,6 ± 18,25	299,8 ± 17,23	315,8 ± 9,40
7 días de tratamiento	260,0 ± 14,70	320,6 ± 13,03 <sup>###</sup>	301,6 ± 18,79	287,8 ± 16,16 <sup>**</sup>	303,8 ± 9,79
10 días de tratamiento	268,0 ± 14,38	332,0 ± 12,19 <sup>###</sup>	297,2 ± 18,04 <sup>**</sup>	283,6 ± 15,55 <sup>***</sup>	291,8 ± 10,27 <sup>***</sup>
14 días de tratamiento	273,0 ± 15,32	326,0 ± 13,37 <sup>###</sup>	299,0 ± 17,85	279,8 ± 15,28 <sup>***</sup>	294,4 ± 9,69 <sup>*</sup>

n = 5; Datos representados como Media ± ETM. Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni;  
<sup>###</sup>P < 0,001 en comparación con el grupo de control de la simulación; <sup>\*\*\*</sup>P < 0,001, <sup>\*\*</sup>P < 0,01 y <sup>\*</sup>P < 0,05 en comparación con el grupo de control de la OBX.

Se controló el consumo de comida en todos los animales de ensayo tras los 14 días de recuperación de la cirugía. Los animales del grupo de control de la OBX mostraron un aumento del 36 % del consumo de comida en comparación con el grupo de control de la simulación. El tratamiento con la composición de ensayo a 10 y 30 mg/kg durante 14 días normalizaba significativamente el consumo de comida.

TABLA 2: EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE ENSAYO SOBRE EL CONSUMO DE COMIDA EN RATAS SOMETIDAS A BULBECTOMÍA OLFATORIA (EN GRAMOS/DÍA)

Tiempo	Control de la Simulación	Control de la OBX	OBX + Composición de ensayo (3 mg/kg)	OBX + Composición de ensayo (10 mg/kg)	OBX + Composición de ensayo (30 mg/kg)
1 día de tratamiento	17,6 ± 0,25	24,0 ± 0,95 <sup>###</sup>	23,1 ± 0,6	23,8 ± 0,97	17,6 ± 0,68 <sup>***</sup>
7 días de tratamiento	19,6 ± 1,07	26,4 ± 0,93 <sup>###</sup>	23,6 ± 0,81 <sup>***</sup>	22,8 ± 0,34 <sup>***</sup>	17,8 ± 0,66 <sup>***</sup>
14 días de tratamiento	18,8 ± 0,8	25,4 ± 0,51 <sup>###</sup>	25,0 ± 0,84	22,7 ± 0,54 <sup>***</sup>	19,8 ± 1,16 <sup>***</sup>

n = 5; Datos representados como Media ± ETM. Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni;  
<sup>###</sup>P < 0,001 en comparación con el grupo de control de la simulación; <sup>\*\*\*</sup>P < 0,001 en comparación con el grupo de control de la OBX

5 La prueba de campo abierto se realizó para evaluar la actividad locomotora de los animales. Los animales con OBX mostraban hiperactividad lo que confirmaba la depresión. El aumento de la puntuación de la deambulacion significaba ansiedad en un animal deprimido expuesto a un nuevo entorno. La composición de ensayo reducía significativamente esta hiperactividad en un 30,3 %, un 51,2 % y un 64,7 % a dosis de 3, 10 y 30 mg/kg.

10 TABLA 3: EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE ENSAYO FRENTE A LA DEPRESIÓN INDUCIDA POR OBX MEDIDO MEDIANTE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN UNA PRUEBA DE CAMPO ABIERTO

Parámetros	Control de la Simulación	Control de la OBX	OBX + Composición de ensayo (3 mg/kg)	OBX + Composición de ensayo (10 mg/kg)	OBX + Composición de ensayo (30 mg/kg)
Puntuación de deambulacion	32,4 ± 1,691	72,6 ± 6,585 <sup>###</sup>	50,6 ± 4,771 <sup>***</sup>	35,4 ± 2,581 <sup>***</sup>	25,6 ± 1,288 <sup>***</sup>
Puntuación de postura erguida	11,2 ± 1,594	24,4 ± 1,806 <sup>##</sup>	19,4 ± 2,561	18,0 ± 3,332	12,8 ± 1,594 <sup>*</sup>
Puntuación de acicalamiento	16,0 ± 1,817	22,8 ± 2,083	16,2 ± 1,96	17,6 ± 1,631	15,2 ± 2,010

n = 5; Datos representados como Media ± ETM. Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni;  
<sup>###</sup>P < 0,001 y <sup>##</sup>P < 0,01 en comparación con el grupo de control de la simulación; <sup>\*\*\*</sup>P < 0,001 y <sup>\*</sup>P < 0,05 en comparación con el grupo de control de la OBX.

15 Los animales del control de la OBX mostraban hipersecreción de corticosterona en la sangre. Los animales tratados con la composición de ensayo a todas las dosis reducían significativamente los niveles de corticosterona en la sangre. La OBX inducía un aumento de la concentración de sodio en suero que era reducida significativamente por la composición de ensayo a 10 y 30 mg/kg. También se observó una reducción de los niveles de azúcar en sangre.

TABLA 4: EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE ENSAYO SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE CORTICOSTERONA y SODIO EN SUERO EN RATAS SOMETIDAS A BULBECTOMÍA OLFATORIA

Parámetros	Control de la Simulación	Control de la OBX	OBX + Composición de ensayo (3 mg/kg)	OBX + Composición de ensayo (10 mg/kg)	OBX + Composición de ensayo (30 mg/kg)
Nivel de corticosterona en suero (µg/ml)	19,38 ± 0,762	47,18 ± 1,598 <sup>###</sup>	39,65 ± 2,955 <sup>*</sup>	28,80 ± 0,993 <sup>***</sup>	23,62 ± 0,561 <sup>***</sup>
Concentración de sodio en suero (mEq/l)	12,95 ± 0,808	39,59 ± 0,744 <sup>###</sup>	36,47 ± 2,547	16,58 ± 1,759 <sup>***</sup>	16,43 ± 1,86 <sup>***</sup>

n = 5; Datos representados como Media ± ETM. Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba de Comparación múltiple de Dunnett para cada parámetro; <sup>###</sup>P < 0,001 en comparación con el grupo de control de la simulación; <sup>\*\*\*</sup>P < 0,001 y <sup>\*</sup>P < 0,05 en comparación con el grupo de control de la OBX.

El estudio muestra la eficacia de la composición de ensayo en el tratamiento de afecciones del síndrome de Cushing, concretamente la ganancia de peso, la depresión, el aumento del consumo de comida, la hipersecreción de cortisol, y el aumento del sodio en suero, inducidas por factores endógenos demostrados mediante ratas sometidas a bulbectomía olfatoria. Por tanto, la composición de ensayo es eficaz en el tratamiento y gestión del síndrome de Cushing y el resto de afecciones del hipercortisolismo.

Los pacientes que padecen depresión sufren intensos dolores musculares o mialgia. Esto puede deberse al aumento de la secreción de cortisol lo que, a su vez, influye en la expresión del dolor que regulan los receptores de 5-HT1A. Mediante la reducción de los niveles de corticosterona en ratas con OBX, la composición de ensayo demostraba un uso potencial en cuanto a aumentar la tolerancia al dolor y, por tanto, una eficacia en el tratamiento y gestión de la mialgia y otras afecciones del dolor neurálgico.

**Ejemplo 5: Efecto en combinación con un antagonista del receptor de 5-HT1A.**

La actividad de la composición de ensayo se evaluó primero bloqueando el receptor de 5-HT1A con un antagonista y después mediante tratamiento con la composición de ensayo. La actividad se midió en términos de tiempo de inmovilidad de los animales de ensayo sometidos a la prueba de nado forzado.

Procedimiento: Ratones Swiss albino macho que pesaban entre 25-30 g se trataron con un antagonista del receptor de 5-HT1A (NAN190) a 1 mg/kg (p.o.) seguido de la administración de la composición de ensayo a 10 mg/kg (p.o.) o bien a 30 mg/kg (p.o.). Una hora después del tratamiento, los animales se sometieron a la prueba de nado forzado y se midió el tiempo de inmovilidad. Se usó un tiempo límite de 360 s.

Resultados: Los animales tratados solamente con la composición de ensayo se sometieron a la prueba de nado forzado y se observó una reducción significativa del tiempo de inmovilidad en comparación con los animales del control normal. Se observó una reducción del tiempo de inmovilidad de aproximadamente un 24,87 % en los animales tratados con 10 mg/kg de la composición de ensayo y de un 30,14 % en los animales tratados con 30 mg/kg de la composición de ensayo. El bloqueo del receptor de 5-HT1A por un antagonista anulaba esta actividad de la composición de ensayo lo que indica que la acción de la composición de ensayo es mediada a través del receptor de 5-HT1A.

TABLA 5: ACTIVIDAD DE LA COMPOSICIÓN DE ENSAYO EN LA PRUEBA DE NADO FORZADO

	Tiempo de inmovilidad (s)	% Reducción del tiempo de inmovilidad
Control normal	214,3 ± 7,98	-
Composición de ensayo (10 mg/kg, p.o.)	161,0 ± 10,7###	24,87
Composición de ensayo (30 mg/kg, p.o.)	149,7 ± 10,99###	30,14
Antagonista del receptor de 5-HT1A NAN-190 (1 mg/kg, p.o.)	232,0 ± 1,63	-8,26
Antagonista del receptor de 5-HT1A NAN-190 (1 mg/kg, p.o.) + Composición de ensayo (10 mg/kg, p.o.)	219,8 ± 7,66	-2,57
Antagonista del receptor de 5-HT1A NAN-190 (1 mg/kg, p.o.) + Composición de ensayo (30 mg/kg, p.o.)	223,7 ± 6,76	-4,39

n = 6; Datos representados como Media ± ETM. Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba de Comparación múltiple de Dunnett. ###P < 0,001 en comparación con el grupo de control normal.

**Ejemplo 6: Efecto de la composición de ensayo sobre la hiperalgesia inducida por nitroglicerina en ratas.**

Este ejemplo evalúa la potencial actividad antimigraña de la composición de ensayo mediante el aumento de la tolerancia al dolor. La nitroglicerina induce hiperalgesia en ratas mediante vasodilatación de las arterias cerebrales similar al dolor migrañoso en seres humanos.

Procedimiento: Se estabularon ratas Wistar de ambos sexos que pesaban 200-250 g en jaulas de plástico durante al menos 10 días antes del ensayo. La hiperalgesia se evaluó usando un aparato para el ensayo del coletazo (UGO BASILE). Las ratas se colocaron en la unidad del ensayo del coletazo de modo que la cola ocluyera una ranura sobre una célula fotoeléctrica. Se aplicó calor mediante radiación IR y la intensidad de la luz se ajustó para dar una reacción normal de 8-12 segundos. Se usó un tiempo límite de 20 segundos a fin de evitar daños en los tejidos. Cuando la rata sintió dolor y dio un coletazo, la luz incidió sobre la célula fotoeléctrica y se anotó el tiempo. Tras tomar lecturas basales, se inyectó a las ratas nitroglicerina intraperitonealmente a una dosis de 10 mg/kg. Quince minutos más tarde, se administró oralmente la composición de ensayo que comprendía un 41 % de asiaticósido, y un 36 % de madecasósido (30 mg/kg) o pentazocina (20 mg/kg). Se midieron las latencias de respuesta 30, 60, 90,

120, 180 y 240 min después del tratamiento.

TABLA 6: LATENCIA DE RESPUESTA EN EL EXPERIMENTO DEL COLETAZO EN HIPERALGESIA INDUCIDA POR NITROGLICERINA EN RATAS

Periodo de tiempo después del tratamiento	Control normal	Control de nitroglicerina (10 mg/kg, i.p.)	Nitroglicerina + Pentazocina (20 mg/kg, p.o.)	Nitroglicerina + Composición de ensayo (30 mg/kg, p.o.)
0	9,38 ± 0,18	8,00 ± 0,09###	8,42 ± 0,22	8,05 ± 0,11
30	8,85 ± 0,18	5,62 ± 0,11###	15,27 ± 0,26***	12,72 ± 0,26***
60	8,03 ± 0,12	5,75 ± 0,12###	15,23 ± 0,17***	12,15 ± 0,14***
90	8,10 ± 0,27	5,97 ± 0,29###	15,78 ± 0,24***	12,88 ± 0,16***
120	8,33 ± 0,12	5,77 ± 0,19###	15,50 ± 0,48***	12,27 ± 0,28***
180	9,42 ± 0,19	6,37 ± 0,25###	15,18 ± 0,45***	12,77 ± 0,35***
240	9,05 ± 0,13	6,62 ± 0,24###	15,03 ± 0,28***	12,32 ± 0,39***

n = 6; Datos representados como Media ± ETM; Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni.  
###P < 0,001 en comparación con el grupo de control normal; \*\*\*P < 0,001 en comparación con el grupo de control de la nitroglicerina.

5

**Resultados:** La composición de ensayo revertía significativamente el aumento de la sensibilidad al dolor inducido por la administración de nitroglicerina en animales. El comienzo de la actividad de la composición de ensayo fue inmediato. Asimismo, la latencia de respuesta en el grupo de la composición de ensayo era más próxima a la de los animales normales que a la del grupo tratado con el fármaco narcótico pentazocina, lo que indica un alivio del dolor sin efectos secundarios sedantes. Este estudio confirma que la composición de ensayo es útil para el tratamiento del dolor y el tratamiento de la migraña, la cefalea en racimos, la cefalea tensional y el resto de cefaleas relacionadas.

10

**Ejemplo 7: Efecto de la composición de ensayo en pacientes que padecen migraña**

15

Se evaluó un estudio prospectivo para determinar la eficacia de la composición de ensayo frente a la incidencia de ataques de migraña en 5 sujetos a los que se diagnosticó migraña crónica. A los sujetos se les administraron cápsulas de la composición de ensayo a una dosis de 300 mg dos veces al día durante un periodo de 1 mes y se analizó la eficacia de la composición de ensayo basándose en el resultado comunicado por el paciente tomado al inicio y al final del periodo de estudio.

20

TABLA 7: EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE ENSAYO EN EL TRATAMIENTO DE LA MIGRAÑA

Síntomas	Resultado registrado por el paciente†									
	Paciente 1		Paciente 2		Paciente 3		Paciente 4		Paciente 5	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
Intensidad de la migraña	2	0	3	0	3	1	3	0	3	2
Frecuencia de los ataques de migraña	1	0	2	0	3	1	2	0	3	2
Náuseas/Vómitos	0	0	0	0	3	3	3	0	2	2
Dependencia de medicamentos para el dolor	1	0	2	0	3	1	3	0	3	3
Cambios conductuales como irritabilidad	0	0	3	0	3	3	2	1	2	2
Tolerancia a la luz, olores y ruidos	2	1	3	0	3	2	3	1	2	2
Diarrea, estreñimiento o calambres	1	1	0	0	0	0	2	1	0	0

†Escala de gravedad de los síntomas de la migraña (0 - Ausencia; 1 - Leve; 2 - Moderado; 3 - Grave)

Tras el inicio de la administración de la composición de ensayo, los sujetos comunicaron una reducción de la frecuencia de los ataques y de la intensidad de las cefaleas migrañosas. Los sujetos comunicaron también una menor dependencia a medicamentos para el dolor. Asimismo, se observó que había una reducción de los síntomas relacionados con la migraña tales como irritabilidad, tolerancia reducida a la luz, olores y ruidos; náuseas, vómitos, etc. Por tanto, se encontró que la composición de ensayo era útil para prevenir y/o aliviar la migraña en sujetos humanos.

#### 10 Ejemplo 8: Formulación de la composición de ensayo

Las cápsulas del ejemplo 7 se prepararon mediante granulación de la composición de ensayo que comprende un 41 % de asiaticósido y un 36 % de madecacosido mezclándola con un 1,5 % p/p de celulosa microcristalina, un 1 % p/p del disgregante almidón pregelatinizado, un 0,5 % p/p de crospovidona y un 0,5 % p/p del antiadherente estearato de magnesio. El granulado mezclado se vertió en cápsulas.

Se puede preparar una formulación similar de la composición de ensayo que varía de un 15-50 % de asiaticósido y un 20-50 % de madecacosido mediante la adición de excipientes seleccionados entre una lista que comprende los siguientes: agentes de granulación, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes disgregantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes de esferonización y cualquier combinación de los mismos. Y el tipo de formulación se puede seleccionar entre un grupo que consiste en comprimidos, cápsulas, trociscos, pastillas para chupar, polvos, jarabes, soluciones aerosoles, suspensiones, gránulos o polvos dispersables, emulsiones en cápsulas de gel duras o blandas, jarabes, elixires, linimentos, pomadas, parches cutáneos, fitocéuticos, nutracéuticos y productos alimentarios. Dependiendo de la vía de administración, se pueden usar diferentes excipientes/vehículos. Los expertos en la materia pueden seleccionar una formulación adecuada de la composición de ensayo para el tratamiento y gestión de la hipercortisolemia (síndrome de Cushing), la migraña, el dolor neuropático, la migraña y dolores relacionados.

#### 30 Ejemplo 9: Efecto de la composición de ensayo sobre el dolor neuropático en animales

Se usó el modelo de lesión por aplastamiento del nervio ciático (*Sciatic Nerve Crush Injury* o SNCI) de dolor neuropático en ratas para evaluar el potencial terapéutico de la composición de ensayo en el tratamiento del dolor neuropático. En el modelo SNCI se produce una denervación parcial que permite el análisis de comportamientos de dolor suscitados por estimulación de la diana de dolor en la pata trasera.

Procedimiento: Se anestesiaron ratas Wistar macho que pesaban 220-250 g usando ketamina (80 mg/kg) y usando condiciones asépticas se expuso el nervio ciático derecho al nivel superior del muslo. El dorso del nervio se liberó de los tejidos conectivos circundantes y usando unas pinzas iris se ligó el nervio en su sitio pellizcando el epineurio en su aspecto dorsal. Se usaron unas pinzas romas para aplastar el nervio dos veces durante un periodo de 30 s con un intervalo de 60 s entremedias. Los animales se dejaron en recuperación tras la cirugía. El día 2 después de la cirugía se administró la composición de ensayo que comprende un 41 % de asiaticósido y un 36 % de madecacosido a 10, 30 y 100 mg/kg (p.o.) y se continuó hasta 30 días. Se evaluaron los parámetros siguientes:

a) Prueba de Randall Selitto - Se aplicó presión mecánica creciente a la pata trasera derecha y se anotó la presión a la cual la rata retiraba la pata como la presión nociceptiva umbral.

10 TABLA 8: PRESIÓN DE RETIRADA DE LA PATA (GRAMOS) EN LA PRUEBA DE RANDALL SELITTO

Tiempo tras la cirugía	Control normal	Control de la Simulación	Control del SNCI	SNCI + Composición de ensayo (10 mg/kg)	SNCI + Composición de ensayo (30 mg/kg)	SNCI + Composición de ensayo (100 mg/kg)
Día 0	267,5 ± 11,24	260,0 ± 10,0 ns	125,0 ± 6,33 <sup>###</sup>	130,0 ± 7,42	137,5 ± 9,02	135,0 ± 9,49
Día 7	282,5 ± 9,81	280,0 ± 10,0 ns	105,0 ± 3,87 <sup>###</sup>	147,5 ± 11,24 <sup>**</sup>	175,0 ± 10,04 <sup>***</sup>	187,5 ± 6,42 <sup>***</sup>
Día 13	277,5 ± 7,5	267,5 ± 8,14 ns	132,5 ± 7,16 <sup>###</sup>	170,0 ± 10,72 <sup>*</sup>	205,0 ± 8,37 <sup>***</sup>	217,5 ± 5,12 <sup>***</sup>
Día 21	285,0 ± 5,48	285,0 ± 7,75 ns	145,0 ± 3,16 <sup>###</sup>	200,0 ± 9,22 <sup>***</sup>	225,0 ± 3,87 <sup>***</sup>	272,5 ± 4,61 <sup>***</sup>

n = 6; Datos representados como Media ± ETM; Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni; ns - no significativo en comparación con el grupo de control normal; <sup>###</sup>P < 0,001 en comparación con el grupo de control de la simulación; <sup>\*\*\*</sup>P < 0,001, <sup>\*\*</sup>P < 0,01 y <sup>\*</sup>P < 0,05 en comparación con el grupo de control del SNCI.

b) Filamento de von Frey - Se evaluó la alodinia mecano-táctil mediante aplicación de una fuerza usando filamentos rígidos de nailon de 1 mm de diámetro contra la superficie media plantar de la pata trasera derecha. Una retirada brusca de la pata trasera derecha se consideró una respuesta positiva y se anotó la fuerza a la que la rata retiraba la pata.

TABLA 9: FUERZA DE RETIRADA DE LA PATA (GRAMOS) EN LA PRUEBA DEL FILAMENTO DE VON FREY

Tiempo tras la cirugía	Control normal	Control de la Simulación	Control del SNCI	SNCI + Composición de ensayo (10 mg/kg)	SNCI + Composición de ensayo (30 mg/kg)	SNCI + Composición de ensayo (100 mg/kg)
Día 0	100,60 ± 1,694	97,65 ± 3,134 <sup>ns</sup>	36,85 ± 1,912 <sup>###</sup>	40,15 ± 3,524	40,05 ± 2,964	46,683 ± 4,002
Día 7	105,72 ± 1,634	101,38 ± 2,64 <sup>ns</sup>	54,9 ± 3,12 <sup>###</sup>	61,73 ± 4,205	61,68 ± 3,54*	75,03 ± 2,441 <sup>***</sup>
Día 13	109,07 ± 1,02	105,18 ± 1,17 <sup>ns</sup>	64,03 ± 1,98 <sup>###</sup>	70,4 ± 3,21	75,57 ± 2,05*	80,1 ± 1,92 <sup>***</sup>
Día 21	107,07 ± 1,49	106,52 ± 1,75 <sup>ns</sup>	66,22 ± 1,64 <sup>###</sup>	75,18 ± 0,89	81,73 ± 1,43 <sup>***</sup>	86,98 ± 1,43 <sup>***</sup>

n = 6; Datos representados como Media ± ETM; Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni; ns - no significativo en comparación con el grupo de control normal; ###P < 0,001 en comparación con el grupo de control de la simulación; \*\*\*P < 0,001 y \*P < 0,05 en comparación con el grupo de control del SNCI.

c) Prueba de inmersión de la cola - Se evaluó la sensibilidad térmica lumbar mediante inmersión de la parte terminal de la cola de la rata a baja temperatura de 0-4 °C y medición de la duración del reflejo de retirada de la cola. Se usó un tiempo límite de 15 segundos.

5 TABLA 10: LATENCIA DE RESPUESTA (SEGUNDOS) EN LA PRUEBA DE INMERSIÓN DE LA COLA

Tiempo tras la cirugía	Control normal	Control de la simulación	Control del SNCI	SNCI + Composición de ensayo (10 mg/kg)	SNCI + Composición de ensayo (30 mg/kg)	SNCI + Composición de ensayo (100 mg/kg)
Día 0	10,17 ± 0,65	9,83 ± 0,83 <sup>ns</sup>	2,97 ± 0,1 <sup>###</sup>	2,9 ± 0,09	3,0 ± 0,07	9,33 ± 0,71
Día 7	11,5 ± 0,56	10,5 ± 0,85 <sup>ns</sup>	2,7 ± 0,09 <sup>###</sup>	3,4 ± 0,11	3,6 ± 0,07	3,93 ± 0,11
Día 13	10,0 ± 0,52	10,5 ± 0,67 <sup>ns</sup>	3,67 ± 0,09 <sup>###</sup>	3,95 ± 0,09	4,35 ± 0,16	6,15 ± 0,16 <sup>***</sup>
Día 21	10,88 ± 0,57	11,17 ± 0,54 <sup>ns</sup>	4,25 ± 0,13 <sup>###</sup>	4,6 ± 0,13	5,08 ± 0,22	6,85 ± 0,16 <sup>***</sup>

n = 6; Datos representados como Media ± ETM; Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni; ns - no significativo en comparación con el grupo de control normal; ###P < 0,001 en comparación con el grupo de control de la simulación; \*\*\*P < 0,001 en comparación con el grupo de control del SNCI.

d) Prueba de coordinación motora - La coordinación motora se evaluó usando un dispositivo Rotarod. Las ratas se colocaron durante 1 min sobre la varilla rotatoria. Se registró el tiempo de caída de la varilla como la fuerza de agarre.

10

TABLA 11: FUERZA DE AGARRE (SEGUNDOS) EN LA PRUEBA DE COORDINACIÓN MOTORA

Tiempo tras la cirugía	Control normal	Control de la simulación	Control del SNCI	SNCI + Composición de ensayo (10 mg/kg)	SNCI + Composición de ensayo (30 mg/kg)	SNCI + Composición de ensayo (100 mg/kg)
Día 0	42,167 ± 1,28	40,83 ± 1,33 <sup>ns</sup>	22,83 ± 0,54 <sup>###</sup>	22,5 ± 0,43	23,0 ± 0,37	24,67 ± 0,76
Día 7	42,17 ± 0,6	42,0 ± 1,21 <sup>ns</sup>	21,5 ± 0,43 <sup>###</sup>	25,0 ± 0,58	26,0 ± 0,37 <sup>**</sup>	27,67 ± 0,56 <sup>***</sup>
Día 13	41,5 ± 0,96	44,17 ± 1,19 <sup>ns</sup>	26,42 ± 0,42 <sup>###</sup>	27,5 ± 0,43	30,5 ± 0,67 <sup>*</sup>	33,5 ± 1,06 <sup>***</sup>
Día 21	43,5 ± 0,96	44,5 ± 1,34 <sup>ns</sup>	28,83 ± 0,4 <sup>###</sup>	30,67 ± 0,42	33,5 ± 1,06 <sup>**</sup>	37,67 ± 0,92 <sup>***</sup>

n = 6; Datos representados como Media ± ETM; Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni; ns - no significativo en comparación con el grupo de control normal; ###P < 0,001 en comparación con el grupo de control de la simulación; \*\*\*P < 0,001, \*\*P < 0,01 y \*P < 0,05 en comparación con el grupo de control del SNCI.

**Resultados:** La composición de ensayo reducía significativamente los síntomas de dolor neuropático inducidos por la lesión por aplastamiento del nervio ciático en ratas. Se observó una reducción significativa de la hiperalgesia, la alodinia y la sensibilidad térmica de la pata lesionada en el tratamiento crónico con la composición de ensayo. La coordinación motora del animal lesionado se normalizó también mediante la composición de ensayo como puede observarse en la prueba del Rotarod. Por tanto, la composición de ensayo es útil en el tratamiento del dolor neuropático y sus síntomas en un uso crónico.

15

#### 20 Ejemplo 10: Efecto de la composición de ensayo en pacientes que padecen dolor neuropático

Se evaluó un estudio prospectivo para determinar la eficacia de la composición de ensayo en el tratamiento del dolor neuropático en 3 pacientes de más de 50 años que padecían diabetes desde hacía 3-5 años. A los sujetos se les administraron cápsulas de la composición de ensayo tal como se formuló en el ejemplo 8, a una dosis de 300 mg dos veces al día durante un periodo de 2 meses y se analizó la eficacia de la composición de ensayo basándose en el resultado comunicado por el paciente tomado al inicio y al final del periodo de estudio.

25

TABLA 12: EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE ENSAYO EN EL TRATAMIENTO DEL DOLOR NEUROPÁTICO

Síntomas	Resultado registrado por el paciente†					
	Paciente 1		Paciente 2		Paciente 3	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
Ataques súbitos de dolor	5	4	5	4	4	2
Sensación de quemazón en el área de dolor	4	3	4	4	4	3
Sensación de hormigueo o pinchazos en el área de dolor	4	3	4	3	4	3
Sensación de entumecimiento en el área de dolor	4	2	2	2	4	4
Dolor desencadenado por aplicación de una ligera presión con un dedo en el área de dolor	0	0	4	3	3	2
Dolor desencadenado por un baño de agua fría/caliente en el área de dolor	0	0	4	3	3	3
Dolor desencadenado por exposición a la luz	0	0	0	0	3	2

†Escala de gravedad de los síntomas del dolor neuropático (0 - Ausencia; 1 - Apenas perceptible; 2 - Leve; 3 - Moderado; 4 - Fuerte; 5 - Muy fuerte)

Tras el inicio de la administración de la composición de ensayo, los sujetos comunicaron una reducción de la frecuencia de los ataques súbitos de dolor. Se comunicó una reducción de la intensidad de las sensaciones de quemazón, hormigueo, entumecimiento y dolor causadas por desencadenantes tales como un contacto, un baño de agua fría o caliente, la exposición a la luz, etc. Se encontró que la composición de ensayo era útil para el tratamiento del dolor neuropático en sujetos humanos.

#### Ejemplo 11: Formulación de pulverización nasal de la composición de ensayo

Se disolvieron 55 mg de la composición de ensayo que comprendía un 46,8 % de asiaticósido y un 31,8 % de madercasósido en 140 ml de solución salina normal (0,09 % p/v de NaCl). A esta se añadieron 10 mg de cloruro de benzalconio y se agitó durante 1 h. Esta mezcla se esterilizó y se filtró a través de un filtro de 0,4 micrómetros y se vertió en botellas de pulverización nasal. Una dosis de pulverización nasal administra 140 µl de la formulación que es equivalente a 55 µg de la composición de ensayo.

#### Ejemplo 12: Efecto de la pulverización nasal sobre la hiperalgesia inducida por nitroglicerina en ratas.

Este ejemplo evalúa la actividad potencial de la composición de ensayo formulada como pulverización nasal. La nitroglicerina induce hiperalgesia en ratas mediante vasodilatación de las arterias cerebrales similar al dolor migrañoso en seres humanos.

**Procedimiento:** Se estabularon ratas Wistar de ambos sexos que pesaban 200-250 g en jaulas de plástico durante al menos 10 días antes del ensayo. La hiperalgesia se evaluó usando un aparato para el ensayo del coletazo (UGO BASILE). Las ratas se colocaron en la unidad del ensayo del coletazo de modo que la cola ocluyera una ranura sobre una célula fotoeléctrica. Se aplicó calor mediante radiación IR y la intensidad de la luz se ajustó para dar una reacción normal de 8-12 segundos. Se usó un tiempo límite de 20 segundos a fin de evitar daños en los tejidos. Cuando la rata sintió dolor y dio un coletazo, la luz incidió sobre la célula fotoeléctrica y se anotó el tiempo. Tras tomar lecturas basales, se inyectó a las ratas nitroglicerina intraperitonealmente a una dosis de 10 mg/kg. Quince minutos más tarde, la composición de ensayo formulada en el Ejemplo 11 se pulverizó en la cavidad nasal. Se midieron las latencias de respuesta 30, 60, 90, 120, 180 y 240 min después del tratamiento.

TABLA 13: EFECTO DE LA FORMULACIÓN DE PULVERIZACIÓN NASAL DE LA COMPOSICIÓN DE ENSAYO EN HIPERALGESIA INDUCIDA POR NITROGLICERINA EN RATAS

Periodo de tiempo después del tratamiento	Control normal	Control de nitroglicerina (10 mg/kg, i.p.)	Nitroglicerina + Pulverización nasal (110 mg/kg)
0	8,8 ± 0,17	8,22 ± 0,17###	8,08 ± 0,32
30	8,7 ± 0,19	6,55 ± 0,17###	9,8 ± 0,67***
60	8,65 ± 0,22	6,12 ± 0,20###	10,77 ± 0,41***
90	8,35 ± 0,12	5,82 ± 0,17###	10,62 ± 0,52***
120	8,42 ± 0,23	6,00 ± 0,22###	10,57 ± 0,67***
240	8,42 ± 0,28	5,88 ± 0,29###	10,67 ± 0,74***

n = 6; Datos representados como Media ± ETM; Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. ###P < 0,001 en comparación con el grupo de control normal; \*\*\*P < 0,001 en comparación con el grupo de control de la nitroglicerina.

- 5 **Resultados:** La composición de ensayo formulada como pulverización nasal revertía significativamente la sensibilidad al dolor inducida por la nitroglicerina. El inicio de la actividad fue inmediato, similar al tratamiento oral mostrado en el Ejemplo 6. La dosis requerida para conseguir este efecto usando una pulverización nasal era también significativamente baja, demostrando una administración potenciada de la composición de ensayo por vía nasal. Este estudio confirma que la composición de ensayo formulada como pulverización nasal es segura y eficaz en el tratamiento del dolor. Por tanto, la composición de ensayo formulada como pulverización nasal es útil en el tratamiento y gestión de la hipercortisolemia (síndrome de Cushing), la migraña, el dolor neuropático, la mialgia y dolores relacionados.

#### Ejemplo 13: Acomplejamiento con ciclodextrina de la composición de ensayo

- 15 Este ejemplo muestra que la composición de ensayo se puede acomplejar con ciclodextrinas, concretamente  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -ciclodextrinas para potenciar la estabilidad de la composición de ensayo frente a los fluidos gástricos o intestinales.

- 20 Se toman 200 ml de agua desmineralizada y se añaden a ésta 50 gramos de  $\beta$ -ciclodextrina con agitación a 80-85 °C para conseguir una solución transparente. A esta se añaden lentamente en porciones 40 gramos de la composición de ensayo que comprende un 46,8 % de asiaticósido y un 31,8 % de madecasósido durante un periodo de 1 h con agitación a 85 °C. La disolución completa de la mezcla mediante la formación de una solución transparente es crucial, tras lo cual la solución se mantiene a 85-90 °C durante 3 h con agitación. Al cabo de 3 h, la solución se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente y la solución se mantiene en agitación durante otras 8 h. La solución se filtra y se seca al vacío a 75 °C hasta peso constante. El rendimiento es de 73 gramos. Se disuelven 25 100 mg de este complejo en 7 ml de agua desmineralizada.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que consiste en asiaticósido y madecasósido, opcionalmente junto con al menos un excipiente para su uso en el tratamiento de una afección patológica seleccionada entre un grupo que comprende hipercortisolemia, trastorno de cefalea y dolor neuropático o cualquier combinación de afecciones de las mismas.
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el asiaticósido está en una concentración que varía de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 50 %; y el madecasósido está en una concentración que varía de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 50 %.
- 15 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición se obtiene de la planta *Centella asiatica*.
- 20 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la afección de hipercortisolemia es el síndrome de Cushing.
- 25 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la afección de trastorno de cefalea se selecciona entre el grupo que comprende migraña, cefalea tensional y cefalea en racimos o cualquier combinación de las mismas.
- 30 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición se administra a un sujeto que necesita la misma, en una dosis que varía de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día.
- 35 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el sujeto es un animal o un ser humano.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el excipiente se selecciona entre un grupo que comprende agentes de granulación, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes disgregantes, agentes edulcorantes, sustancias de deslizamiento, agentes antiadherentes, agentes antiestáticos, tensioactivos, antioxidantes, gomas, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, agentes aromatizantes, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, material celulósico vegetal, y agentes de esferonización o cualquier combinación de los mismos.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición se formula en formas de dosificación seleccionadas entre el grupo que comprende comprimidos, grajeas, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, ungüentos, parches, geles, lociones, dentífricos, cápsulas, emulsiones, cremas, pulverizaciones, gotas, gránulos o polvos dispersables, emulsiones en cápsulas de gel duras o blandas, jarabes, elixires, fitocéuticos, nutracéuticos y productos alimentarios o cualquier combinación de los mismos.

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

- **US 20080194499 A, Bhaskaran [0013]**

10

**Literatura no patente citada en la descripción**

- **LAMPL et al.** Antidepressants for Migraine Prophylaxis. *European Neurological Journal*, 2010 [0007]
- **MEIJER et al.** *Eur J Pharmacol*, 1994, vol. 266 (3), 255-61 [0012]