

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 604**

51 Int. Cl.:

C07D 493/04 (2006.01)

A61K 31/34 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2014 PCT/CN2014/094693**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16019683**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2014 E 14899456 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 3178822**

54 Título: **Ester de ibuprofeno de filigenina, su procedimiento de preparación y aplicaciones del mismo**

30 Prioridad:

07.08.2014 CN 201410387045

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

03.01.2020

73 Titular/es:

**FU, LI (100.0%)
No. 5 Tieshan Mid-road Economy&Technology
Development Zone
Dalian 116600, CN**

72 Inventor/es:

**FAN, HONGYU;
WANG, SHUO y
FU, LI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 736 604 T3

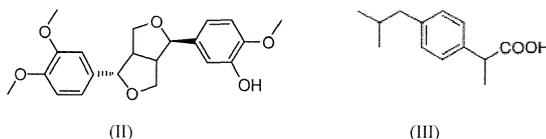
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Ester de ibuprofeno de filigenina, su procedimiento de preparación y aplicaciones del mismo

La presente invención pertenece al campo de la química farmacéutica y específicamente se relaciona con un éster de ibuprofeno de filigenina que tiene efectos farmacológicos antivirales, antipiréticos, antiinflamatorios y analgésicos.

La filigenina, también denominada como filigenol, es la porción de aglicona de filirina. Es el principal ingrediente activo de las especies de planta *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl del género *Forsythia* de la familia Oleaceae, cuya estructura es representada por la fórmula (II). Los estudios farmacológicos modernos indican que la filigenina tiene los efectos de antivirus, antioxidación, reducción de lípidos en la sangre, eliminación de radicales libres, antibacteriano, antitumor, antiinflamación y similares.



Las moléculas de filigenina son inestables y se oxidan fácilmente, y la configuración molecular es susceptible de cambio en el ambiente ácido. Se ha hallado que las moléculas de filigenina son metabolizadas con extrema facilidad hasta nuevos metabolitos, por la flora intestinal, a través del estudio del metabolismo de filirina simulado por las bacterias intestinales de la rata.

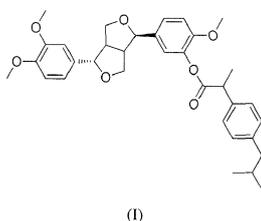
El ibuprofeno es una medicina no esteroide efectiva como antiinflamatorio y analgésico, cuya estructura es representada por la fórmula (III), pero una medicación de largo plazo causará efectos laterales tales como dispepsia, úlcera gástrica y toxicidad para el hígado y similares. En 1989, Angelini company de Italia desarrolló y comercializó un éster de ibuprofeno guayacol, sintetizado de ibuprofeno y guayacol, y el éster de ibuprofeno guayacol no se degrada en el tracto gastrointestinal humano, sino que es descompuesto en ibuprofeno y guayacol después de entrar en la sangre, continúa ejerciendo efectos antipirético, analgésico y antiinflamatorio de ibuprofeno *in vivo*, y entretanto reduce su irritación sobre el tracto gastrointestinal y reduce la toxicidad al hígado. En 2004, Xiuli Zhao de Shenyang Pharmaceutical University llevó a cabo la esterificación de ibuprofeno con eugenol para obtener un compuesto farmacéutico de éster de eugenol ibuprofeno, que también tiene efectos antivirales, antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios *in vivo*. Además, el compuesto farmacéutico de éster de eugenol ibuprofeno tiene mejorada la estabilidad de eugenol (CN-A-1597656).

Hasta ahora, no se han encontrado los reportes y registros de la síntesis del compuesto de éster de filigenina y las actividades farmacológicas, y por ello se ha obtenido el éster de ibuprofeno de filigenina a través de la reacción de esterificación de filigenina con ibuprofeno y se espera obtener un nuevo compuesto que sea más estable y que tenga diferentes efectos farmacológicos de antivirus, antipirexis, antiinflamación y analgesia y similares.

El documento US-A-4150137 divulga ésteres de ibuprofeno como agentes analgésicos y antiinflamatorios.

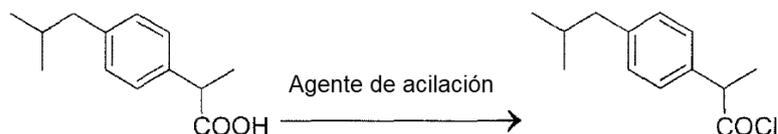
El propósito de la presente invención es suministrar un nuevo compuesto antiviral de éster de ibuprofeno de filigenina, un procedimiento de preparación para ello y aplicaciones del mismo en vista de los problemas existentes en las técnicas previas anteriores. El éster de ibuprofeno de filigenina suministrado por la presente invención tiene efectos antivirales, antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios y puede ser usado para preparar medicinas o productos para la salud para el tratamiento de antivirus, antipirexis y analgesia. El procedimiento de preparación para éster de ibuprofeno de filigenina es simple y conveniente para la operación, y es adecuado para la producción a escala industrial.

En un aspecto, la presente invención suministra un compuesto de éster de ibuprofeno de filigenina con una fórmula estructural general como se representa por la fórmula (I):



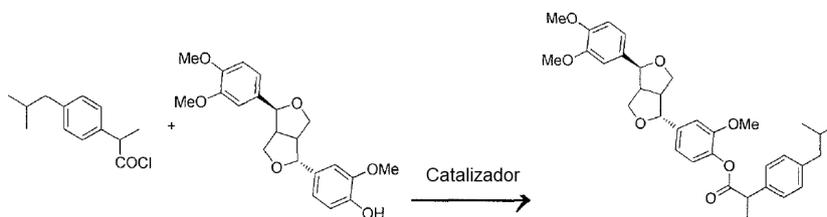
En otro aspecto, la presente invención suministra un procedimiento de preparación para el compuesto de éster de ibuprofeno de filigenina, que comprende las etapas conducidas de acuerdo con la siguiente secuencia:

- 5 A) el ibuprofeno es sometido a una reacción de acilación con un agente de acilación, para preparar cloruro de acil ibuprofeno;



y

- B) se lleva a cabo una reacción de esterificación, entre filigenina y cloruro de acil ibuprofeno, en la presencia de un catalizador para obtener el producto.



- 10 El agente de acilación en la etapa A) puede ser seleccionado de cloruro de tionilo, tricloruro de fósforo, pentacloruro de fósforo, oxiclорuro de fósforo u oxipentacloruro de fósforo.

En particular, la temperatura de reacción de la reacción de acilación es 10-30°C.

En particular, la relación molar de ibuprofeno al agente de acilación es 1:10-1:12, preferiblemente 1:10.

- 15 En particular, el tiempo de reacción es 12 h a 24 h, preferiblemente 15 h a 24 h.

En particular, en primer lugar se disuelve ibuprofeno en un solvente orgánico y entonces se mezcla con el agente de acilación, y entonces se lleva a cabo la reacción de acilación.

La cantidad del solvente orgánico usado puede ser tal que cada 1 mol de ibuprofeno es disuelto en 3 litros a 4 litros del solvente orgánico, preferiblemente 4 litros del solvente orgánico.

- 20 En particular, el solvente orgánico es seleccionado de tolueno, benceno, acetona, diclorometano y triclorometano, preferiblemente diclorometano y acetona, y más preferiblemente diclorometano.

En particular, el procedimiento de preparación comprende además un tratamiento de concentración de la mezcla después de la reacción de acilación en un estado de vacío, y retiro del solvente orgánico para obtener el cloruro de acil ibuprofeno.

- 25 En particular, se lleva a cabo un tratamiento de evaporación, bajo presión reducida para retirar el solvente orgánico.

El catalizador en la etapa B) puede ser seleccionado de una base orgánica o una base inorgánica.

En particular, la relación de filigenina al catalizador es 1:1 a 1.2:1, preferiblemente 1:1.

- 30 La base inorgánica puede ser seleccionada de carbonato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de sodio o bicarbonato de potasio. La base orgánica puede ser seleccionada de piridina, trietilamina, N,N-dimetilformamida o un alcóxido metálico.

En particular, el alcóxido metálico es seleccionado de metanolato de sodio o tert-butóxido de potasio.

ES 2 736 604 T3

La relación molar de filigenina en la etapa B) a ibuprofeno en la etapa A) puede ser 0.8:1 a 1.2:1, preferiblemente 1:1.

En particular, la temperatura de la reacción de esterificación es 30°C a 70°C, preferiblemente 40°C a 60°C. El tiempo de reacción de la reacción de esterificación puede ser 12 h a 24 h, preferiblemente 15 h a 20 h.

- 5 La reacción de esterificación en la etapa B) puede ser llevada a cabo en un estado de calentamiento después de que la filigenina y el cloruro de acil ibuprofeno son añadidos al solvente orgánico.

En particular, el solvente orgánico es seleccionado de tolueno, benceno, acetona, diclorometano y triclorometano, preferiblemente diclorometano o acetona.

- 10 En particular, primero se disuelve la filigenina en el solvente orgánico, a continuación se añade el catalizador y se mezcla uniformemente la mezcla y entonces a la mezcla uniformemente mezclada se añade el cloruro de acil ibuprofeno preparado en la etapa A), con lo cual se lleva a cabo la reacción de esterificación en el estado de agitación y calentamiento.

En particular, el solvente orgánico es seleccionado de tolueno, benceno, acetona, diclorometano y triclorometano, preferiblemente diclorometano o acetona.

- 15 En particular, la cantidad de solvente orgánico usado es tal que cada 1 mol de filigenina es disuelto en 15 litros a 25 litros del solvente orgánico, preferiblemente 20 litros del solvente orgánico.

- 20 En particular, el procedimiento de preparación comprende además la etapa de C), en el cual después de la reacción de esterificación, el producto es sometido al tratamiento de aislamiento y purificación: C-1) después de la reacción de esterificación se enfría la mezcla y desciende la temperatura; C-2) a continuación se somete la mezcla al tratamiento de filtración, el filtrado es sometido al tratamiento de concentración y se retira el solvente; C-3) entonces, después de retirar el solvente orgánico se somete la sustancia sólida al tratamiento de recristalización, para obtener éster de ibuprofeno de filigenina.

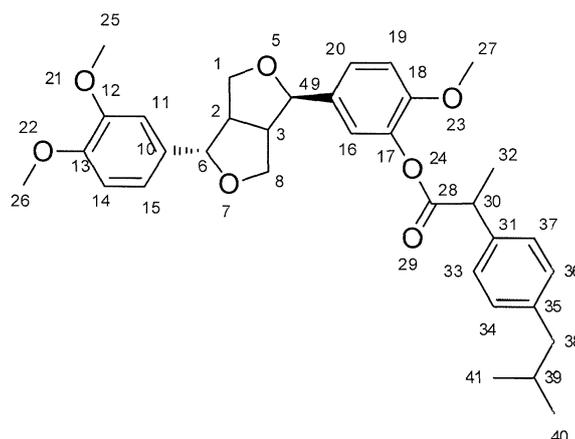
- 25 Después de la reacción de esterificación en la etapa C-1) puede enfriarse la mezcla hasta 20°C a 30°C. El tratamiento de concentración en la etapa C-2) puede ser para evaporar la mezcla fría en un estado de vacío, para retirar el solvente orgánico. El solvente del tratamiento de recristalización en la etapa C-3) puede ser éter de petróleo o hexano.

El compuesto de la presente invención preparado por el procedimiento mencionado anteriormente es éster de ibuprofeno de filigenina, el cual a temperatura ambiente es un sólido blanco. La estructura del éster de ibuprofeno de filigenina está confirmada y se analiza como sigue:

- 30 Espectro de masas de alta resolución: 583,26663; $C_{34}H_{40}O_7Na^{+1}$;

- 35 Espectro de absorción infrarrojo: pico característico de absorción (cm^{-1}) 2.953,73 (-CH₃); 2.867,21 (-CH₂-); 29.835,45 (Ar-OCH₃); 1.760,11 (C=O); 1.606,25, 1.591,38, 1.514,46 (Ar-CH); y 1.270,57, 1.042,86 (Ar-O-C). ¹H-RMN: (CDCl₃, 600 MHz) δppm: 6,856-6,961 (m, 6H), 7,135-7,145 (m, 2H), 7,322-7,335 (d, 2H, J = 7,8Hz), 4,860-4,853 (d, 1H, J = 4,2 Hz), 4,494-4,484 (d, 1H, J = 6 Hz), 4,145-4,129 (d, 1H, J = 9,6 Hz), 3,988-3,976 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 3,900-3,843 (s, 8H), 3,720-3,713 (s, 3H), 3,346-3,323 (s, 2H), 2,891-2,881 (d, 1H, J = 6 Hz), 2,481-2,470 (d, 2H, J = 6,6 Hz), 1,882-1,860 (s, 1H), 1,620-1,609 (d, 3H, J = 6,6 Hz), 0,920-0,910 (s, 6H).

- 40 ¹³C-RMN: (CDCl₃, 125 MHz) δppm: 172,901(C-28), 151,374(C-12), 148,880(C-18), 148,056(C-13), 140,635(C-35), 140,203(C-17), 139,486 (C-10), 137,436(C-9), 130,971(C-31), 129,328(C-33), 127,445(C-36), 127,445(C-37), 122,578(C-34), 118,045(C-20), 117,767(C-16), 111,097(C-15), 110,035(C-14), 110,015(C-19), 109,020(C-11), 87,345(C-6), 82,043(C-4), 71,107(C-1), 69,830(C-8), 55,958(C-OMe), 55,933(C-OMe), 55,851(C-OMe), 54,694(C-2), 50,101(C-3), 45,107(C-38), 45,040(C-30), 30,252(C-39), 22,448(C-40, 41), 18,803(C-32).



En todavía otro aspecto, la presente invención suministra un éster de ibuprofeno de filigenina como se definió aquí anteriormente para el uso como un agente antiviral.

- 5 En todavía otro aspecto, la presente invención suministra aplicaciones del éster de ibuprofeno de filigenina como se definió aquí anteriormente, en la preparación de fármacos antivirales o productos para la salud.

La presente invención también suministra aplicaciones del éster de ibuprofeno de filigenina como se definió aquí anteriormente, en la preparación de fármacos antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios o productos para la salud.

- 10 La presente invención suministra una composición farmacéutica o de producto para la salud que contiene éster de ibuprofeno de filigenina como se definió aquí anteriormente y que tiene eficacia antiviral, antipirética, analgésica y antiinflamatoria.

En particular, la composición farmacéutica comprende éster de ibuprofeno de filigenina de la presente invención y excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 15 Los excipientes farmacéuticamente aceptables se refieren a materiales de relleno sólidos, semisólidos o líquidos, diluyentes, vehículos, reguladores de pH, agentes para ajustar la fuerza iónica, agentes de liberación extendida o liberación controlada, materiales encapsulantes u otros excipientes farmacéuticos, no tóxicos. El vehículo usado puede ser adaptado al correspondiente procedimiento de administración y puede ser formulado en inyecciones, polvos liofilizados (para inyección), atomizados, soluciones orales, suspensiones orales, comprimidos, cápsulas, comprimidos gastrorresistentes, píldoras, polvos, gránulos, formulaciones de liberación sostenida o liberación retardada y similar, con los excipientes que son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Preferiblemente el éster de ibuprofeno de filigenina del primer aspecto de la presente invención es administrado por la vía de inyección o a través del tracto digestivo y por ello la composición farmacéutica de la presente invención es preferiblemente una inyección o una formulación a través de la administración por el tracto digestivo, es decir se prefieren particularmente los excipientes adaptados para ser formulados para administración por la vía de inyección o a través del tracto digestivo. Allí "*administración a través del tracto digestivo*" se refiere a una aproximación para administrar las formulaciones de medicina a través del tracto digestivo del paciente, incluyendo administración oral, administración intragástrica, y administración por enema y similares, preferiblemente administración oral, por ejemplo, los excipientes que son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica
- 20 pueden ser usados para formularse dentro de soluciones orales, suspensiones orales, comprimidos, cápsulas, comprimidos entéricos, píldoras, polvos, gránulos, preparaciones de liberación sostenida o liberación retardada y similares; en los que las preparaciones por inyección son principalmente inyecciones e inyecciones en polvo.

- 35 El nuevo compuesto de éster de ibuprofeno de filigenina de la presente invención tiene eficacia antiviral, antipirética, analgésica y antiinflamatoria y puede ser usado para preparar fármacos antivirales, antipiréticos, analgésicos, antiinflamatorios o productos de salud. El éster de ibuprofeno de filigenina es preparado mediante la reacción de esterificación y el procedimiento de preparación tienen las ventajas de suaves condiciones de reacción, alto rendimiento, bajo consumo de energía, amigabilidad con el medio ambiente, condiciones del proceso de operaciones fácilmente controladas y calidad fuertemente controlable, y es adecuado para producciones industriales a gran escala.

- 40 En la reacción de esterificación mencionada anteriormente, se disuelve la filigenina en un solvente orgánico adecuado, y se añade cloruro de acil ibuprofeno al sistema de reacción para llevar a cabo la reacción de esterificación por 10 h a 24 h. Una vez se ha detenido reacción, el líquido de reacción es lavado con agua hasta

que está neutro, se añade un desecante para retirar finalmente el agua, se evapora el solvente orgánico bajo presión reducida hasta obtener un sólido blanco, y el sólido resultante es recristalizado para obtener el éster de ibuprofeno de filigenina.

Fig.1 es el espectro ^1H -RMN de éster de ibuprofeno de filigenina de la presente invención;

5 Fig.2 es el espectro ^{13}C -RMN de éster de ibuprofeno de filigenina de la presente invención;

Fig.3 es el espectro de absorción infrarroja (IR) de éster de ibuprofeno de filigenina de la presente invención;

Fig.4 son secciones patológicas del tejido de pulmón de un ratón modelo infectado con virus de influenza neumonía, en las que A es el tejido de pulmón de un ratón normal; B es el tejido de pulmón de un ratón infectado con virus de influenza neumonía; C es el tejido de pulmón de un ratón infectado con virus de influenza neumonía después del tratamiento en un grupo de dosis elevada de éster de ibuprofeno de filigenina; D es el tejido de pulmón de un ratón infectado con virus de influenza neumonía después del tratamiento en un grupo de dosificación media de éster de ibuprofeno de filigenina; E es el tejido de pulmón de un ratón infectado con virus de influenza neumonía después del tratamiento en un grupo de baja dosificación de éster de ibuprofeno de filigenina; y F es el tejido de pulmón de un ratón infectado con virus de influenza neumonía después del tratamiento con Tamiflu.

10
15

La presente invención será descrita más a través de los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solamente ilustrativos de la presente invención, y no deberían ser interpretados como una limitación al alcance de la presente invención. Adicionalmente, los reactivos y las materias primas en los ejemplos pueden ser obtenidos de fuentes comerciales, y para más detalles, puede referirse a las guías de síntesis orgánica, guías de supervisión de fármacos y agencias de administración, e instrucciones de los fabricantes de los correspondientes aparatos y reactivos.

20

Ejemplo 1

1. Reacción de acilación

Se alimentó ibuprofeno (2,06 g, 0,01 mol) a un recipiente de tres cuellos, y se disolvió en 40 ml de diclorometano; se añadió un reactivo de acilación de cloruro de tionilo (11,9 g, 0,1 mol) al recipiente de tres cuellos, la reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente (20°C) por 15 h, y se evaporó el diclorometano con una presión reducida (es decir bajo la condición de vacío) para obtener cloruro de acil ibuprofeno, en el que la relación molar de ibuprofeno al agente de acilación fue 1:10;

25

2. Esterificación

Se colocó filigenina (3,72 g, 0,01 mol) dentro de un recipiente de tres cuellos que contenía 200 ml de la acetona, y se mezcló uniformemente la mezcla; consecuentemente se añadió el catalizador de carbonato de potasio (1,5 g, 0,01 mol), y se mezcló uniformemente la mezcla; entonces se añadió gota a gota dentro del recipiente de tres cuellos cloruro de acil ibuprofeno (2,24 g, 0,01 mol) preparado en la etapa 1); se calentó la mezcla a 60°C mientras se agitaba, y se llevó a cabo la reacción de esterificación por 15 h mientras se mantenía la temperatura de 60°C;

30
35

3. Aislamiento y tratamiento de purificación

La mezcla resultante de la reacción de esterificación fue enfriada hasta temperatura ambiente (20°C-25°C), se filtró la mezcla, se retiró el residuo sólido, y se evaporó el filtrado con una presión reducida para recuperar el solvente acetona y se obtuvo el residuo sólido;

el sólido resultante después de recuperar el solvente fue disuelto en diclorometano, la solución resultante fue lavada con agua hasta que fue neutra y se la secó con sulfato de sodio anhidro, y se evaporó el solvente diclorometano bajo la condición de vacío (es decir, presión reducida) para obtener un sólido blanco.

40

El sólido blanco resultante fue sometido al tratamiento de recristalización con éter de petróleo para obtener éster de ibuprofeno de filigenina (5,49 g) con 98%.

El éster de ibuprofeno de filigenina es un sólido blanco, punto de fusión: 110°C; solubilidad: soluble en metanol; cloroformo, y diclorometano y similares.

Espectro de masas de alta resolución: 583,26663 $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{Na}_{+1}$; peso molecular: 561.

Espectro de radiación infrarroja: pico característico de absorción (cm^{-1}) 2.953,73 (-CH₃); 2.867,21 (-CH₂-); 29.835,45 (Ar-OCH₃); 1.760,11 (C=O); 1.606,25, 1.591,38, 1.514,46 (Ar-CH); 1.270,57, 1.042,86 (Ar-O-C), como

se muestra en la Fig.3.

¹H-RMN: (CDCl₃, 600 MHz) δppm: 6,856-6,961 (m, 6H), 7,135-7,145 (m, 2H), 7,322-7,335 (d, 2H, J = 7,8Hz), 4,860-4,853 (d, 1H, J = 4,2 Hz), 4,494-4,484 (d, 1H, J = 6 Hz), 4,145-4,129 (d, 1H, J = 9,6 Hz), 3,988-3,976 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 3,900-3,843 (s, 8H), 3,720-3,713 (s, 3H), 3,346-3,323 (s, 2H), 2,891-2,881 (d, 1H, J = 6 Hz), 2,481-2,470 (d, 2H, J = 6,6 Hz), 1,882-1,860 (s, 1H), 1,620-1,609 (d, 3H, J = 6,6 Hz), 0,920-0,910 (s, 6H), como se muestra en la Fig.1.

¹³C-RMN: (CDCl₃, 125 MHz) δppm: 172,901(C-28), 151,374(C-12), 148,880(C-18), 148,056(C-13), 140,635(C-35), 140,203(C-17), 139,486 (C-10), 137,436(C-9), 130,971(C-31), 129,328(C-33), 127,445(C-36), 127,445(C-37), 122,578(C-34), 118,045(C-20), 117,767(C-16), 111,097(C-15), 110,035(C-14), 110,015(C-19), 109,020(C-11), 87,345(C-6), 82,043(C-4), 71,107(C-1), 69,830(C-8), 55,958(C-OMe), 55,933(C-OMe), 55,851(C-OMe), 54,694(C-2), 50,101(C-3), 45,107(C-38), 45,040(C-30), 30,252(C-39), 22,448(C-40, 41), 18,803(C-32), como se muestra en la Fig.2.

Ejemplo 2

1. Reacción de acilación

Se alimentó ibuprofeno (2,06 g, 0,01 mol) a un recipiente de tres cuellos, y se disolvió en 40 ml de diclorometano; el reactivo de acilación de oxiclورو de fósforo (15,3 g, 0,1 mol) fue añadido al recipiente de tres cuellos, la reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente (30°C) por 15 h, y se evaporó el diclorometano con una presión reducida (es decir, bajo la condición de vacío) para obtener cloruro de acil ibuprofeno, en el que la relación molar de ibuprofeno al agente de acilación era 1:10;

2. Reacción de esterificación

Se colocó filigenina (3,72 g, 0,01 mol) dentro de un recipiente de tres cuellos que contenía 200 ml de un solvente diclorometano, y se mezcló uniformemente la mezcla; consecuentemente se añadió el catalizador de trietilamina (1,5 ml, 0,01 mol), y se mezcló uniformemente la mezcla; entonces dentro del recipiente de tres cuellos se añadió gota a gota cloruro de acil ibuprofeno (2,24 g, 0,01 mol) preparado en la etapa 1); se calentó la mezcla a 40°C mientras se agitaba, y se llevó a cabo la reacción de esterificación por 20 h mientras se mantenía la temperatura de 40°C;

3. Aislamiento y tratamiento de purificación

La mezcla resultante de la reacción de esterificación fue enfriada hasta temperatura ambiente (20°C-25°C), se filtró la mezcla, se retiró el residuo sólido, y se evaporó el filtrado con una presión reducida para recuperar el solvente diclorometano y se obtuvo el residuo sólido;

el sólido resultante después de recuperar el solvente fue disuelto en diclorometano, la solución resultante fue lavada con agua hasta que fue neutra y se la secó con sulfato de sodio anhidro, y se evaporó el solvente diclorometano bajo la condición de vacío (es decir, presión reducida) para obtener un sólido blanco.

El sólido blanco resultante fue sometido al tratamiento de recristalización con éter de petróleo para obtener éster de ibuprofeno de filigenina (5,44 g) con un rendimiento de 97%.

Las propiedades físicoquímicas, datos espectrales y datos espectrales de masa del sólido blanco obtenido mediante la recristalización fueron consistentes con aquellos de éster de ibuprofeno de filigenina preparado en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

1. Reacción de acilación

Se alimentó ibuprofeno (2,06 g, 0,01 mol) a un recipiente de tres cuellos, y se disolvió en 40 ml de diclorometano; el reactivo de acilación de oxipentacloruro de fósforo (20,8 g, 0,1 mol) fue añadido al recipiente de tres cuellos, la reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente (10°C) por 15 h, y se evaporó el diclorometano con una presión reducida (es decir, bajo la condición de vacío) para obtener cloruro de acil ibuprofeno, en el que la relación molar de ibuprofeno al agente de acilación era de 1:10;

2. Reacción de esterificación

Se colocó filigenina (3.72 g, 0.01 mol) dentro de un recipiente de tres cuellos que contenía 200 ml de un solvente triclorometano, y se mezcló uniformemente la mezcla; consecuentemente se agregó el catalizador metóxido de sodio (1,5 ml, 0,01 mol), y se mezcló uniformemente la mezcla; entonces se agregó dentro del

recipiente de tres cuellos gota a gota cloruro de acil ibuprofeno (2,24 g, 0,01 mol) preparado en la etapa 1); se calentó la mezcla a 50°C mientras se agitaba, y se llevó a cabo la reacción de esterificación por 17 h mientras se mantenía una temperatura de 50°C;

3. Aislamiento y tratamiento de purificación

5 La mezcla resultante de la reacción de esterificación fue enfriada hasta temperatura ambiente (20°C-30°C), se filtró la mezcla, se retiró el residuo sólido, y se evaporó el filtrado con una presión reducida para recuperar el solvente triclorometano y se obtuvo residuo sólido;

10 el sólido resultante después de recuperar el solvente fue disuelto en diclorometano, la solución resultante fue lavada con agua hasta que fue neutra y se la secó con sulfato de sodio anhidro, y se evaporó el solvente de diclorometano bajo la condición de vacío (es decir, presión reducida) para obtener un sólido blanco.

El sólido blanco resultante fue sometido al tratamiento de recristalización con éter de petróleo, para obtener éster de ibuprofeno de filigenina (5,49 g) con un rendimiento de 98%.

15 Las condiciones fisicoquímicas, datos espectrales y datos espectrales de masa del sólido blanco obtenido mediante la recristalización, fueron consistentes con los de éster de ibuprofeno de filigenina preparado en el Ejemplo 1.

Ejemplo 1 de ensayo, ensayo antiviral de éster de ibuprofeno de filigenina

1 Ensayo antiviral *in vitro*

1.1 Materiales de ensayo

(1) Fármacos

20 ① éster de ibuprofeno de filigenina: un sólido blanco (preparado en Ejemplo 1), manufacturado por Dalian Fusheng Natural Drug Development Co., Ltd., y determinado mediante dos detectores de cromatografía líquida de alto desempeño, es decir, el detector ultravioleta y detector evaporativo de dispersión de luz, mediante el procedimiento de normalización de área; y la pureza del mismo es 99,1%.

25 ② inyección de ribavirina: una solución incolora y transparente, manufacturada por Henan Runhong Co., Ltd., y el número de lote de producto es (lote No.): 1206261, National medical Permitment No.:H 19993553, 100 mg/ml, adoptado como el fármaco de control positivo para el presente ensayo;

③ fosfato de oseltamivir: disponible de National Institute for Control de Pharmaceutical & Biological Products, con lote No. 101096-200901;100 mg/cada uno, adoptado como el fármaco de control positivo para el presente ensayo;

30 ④ filigenina: un polvo blanco, manufacturado por Dalian Fusheng Natural Drug Development Co., Ltd., y determinado mediante dos detectores de cromatografía líquida de alto desempeño, es decir, el detector ultravioleta y detector evaporativo de dispersión de luz, mediante el procedimiento de normalización de área; y la pureza del mismo es 99.1%.

35 ⑤ ibuprofeno: comprado a National Institute for Control de Pharmaceutical y Biological Products, con No. de lote: 0179-9702.

Todos los fármacos mencionados anteriormente fueron disueltos con agua purificada, filtrada, esterilizada, subempacada, y almacenada a 4°C para aplicación en espera; todos ellos eran fármacos que iban a ser probados en el presente ensayo.

(2) Cepa celular

40 La cepa de célula de Vero (células de riñón de mono verde africano) fue preservada por College of Basic Medical Sciences de Jilin University.

(3) Cepas de virus

① virus de influenza, virus de parainfluenza, virus respiratorio sincitial (RSV): comprado del Virology Institute of Chinese Academy of Preventive Medicine;

45 ② virus coxsackie B3 (CVB3) : comprado de Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences;

- ③ virus coxsackie A16 (CoxA16) y Enterovirus EV71: comprado de Sendai National Hospital de Japón;
- ④ adenovirus (AdV): comprado Pediatric Research Department de The First Hospital of Norman Bethune Medical University;
- ⑤ virus tipo I de Herpes Simplex (HSV-1): comprado a National Institute for the Control de Pharmaceutical and Biological Products, Ministry of Health.

5

(4) Principales equipos y reactivos

Cabina de seguridad biológica: BHC-1300 II A/B3, AIRTECH;
 Incubadora de CO₂: MCO-18AIC, SANYO;
 Microscopio invertido: CKX41, OLYMPUS;
 Balanza analítica electrónica: AR1140/C, DHAUS;
 Medio de cultivo: DMEM, HyClone;
 Suero fetal bovino: HyClone;
 Tripsina: Gibco;
 MTT: Sigma;
 DMSO: Tianjin Beilian Fine Chemicals Development Co., Ltd.

10

15

1.2 Procedimientos de ensayo

(1) Preparación de células

Se subcultivaron células Vero por 1-2 días para formar una película, y cuando la línea de frontera era clara y el sentido tridimensional y la dioptría fueron fuertes, fueron sometidas a digestión con la enzima pancreática; cuando hubo pocillos en forma de aguja sobre la superficie de la célula, se drenó completamente el jugo digestivo, y se dispersaron las células con varios mililitros de medio de cultivo, se contaron y entonces se diluyeron a aproximadamente 5×10^7 células/litro con el medio de cultivo (DMEM que contenía 10% de suero fetal bovino) y se inocularon en una placa de cultivo de 96 pocillos hasta que las células crecieron para formar una monocapa.

20

(2) Determinación de la toxicidad del fármaco

25

Ensayo de citotoxicidad: se diluyeron los fármacos de acuerdo con las concentraciones de la tabla 1-1 para la determinación de citotoxicidad.

Tabla 1-1 Tabla de referencia de dilución de fármaco (unidad: g/l)

Concentración de gradiente Fármaco	Gradiente	Gradiente	Gradiente	Gradiente	Gradiente	Gradiente 6	Gradiente 7	Gradiente 8
	1	2	3	4	5			
Éster de ibuprofeno de filigenina	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125	0,039063
Ribavirina	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125	0,039063
Fosfato de oseltamivir	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625
Filigenina	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125	0,039063
Ibuprofeno	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125	0,039063

30

Los fármacos anteriores, que fueron diluidos con una solución de mantenimiento (DMEM que contenía 2% de

5 suero fetal bovino) hasta diferentes concentraciones, fueron añadidos gota a gota a la célula de monocapa Vero con 0,2 ml por poro, y para cada concentración, los fármacos fueron añadidos en sextuplicado en 6 poros respectivamente. Adicionalmente, se ajustaron 6 poros como control normal (sin fármacos) mientras otros 6 poros como control de blanco (medio solamente). Las células fueron cultivadas en una incubadora a 37 °C bajo 5% de CO₂ y CEP y fueron observadas diariamente con microscopio invertido, y se tomaron registros. Después de 72 horas, se añadieron 20 µl (5 mg ml⁻¹) de solución MTT a cada pocillo y se incubaron secuencialmente por 4 horas, se succionó y descartó el medio de cultivo de cada pocillo, se añadieron 100 µl de DMSO a cada pocillo, se agitó por 5 minutos, y se midió el valor OD a 492 nm para calcular la rata de supervivencia celular. En el software estadístico SPSS 18.0 se sometió la rata de supervivencia celular al análisis de regresión Probit, para calcular la máxima concentración no tóxica (TC₀) y concentración de toxicidad mediana (TC₅₀) del fármaco, contra la célula Vero.

(3) Determinación de TCID₅₀ de diferentes virus

15 Se diluyeron diferentes virus en un descenso de 10 veces para tener diferentes diluciones de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵. A cada uno de los sextuplicados de poros de una placa de cultivo de 96 poros que contenía células de monocapa Vero se inocularon 100 µl de diluyente para cada dilución en secuencia, mientras se ajustó el control de célula normal. Se incubaron las placas por 2 h a 37°C en 5% de CO₂ seguido por el retiro de la solución de virus, y se añadieron 100 µl de medio de mantenimiento celular a cada uno de los poros, para posterior incubación a 37°C en 5% de CO₂. Se examinó el efecto citopático bajo el microscopio desde el 3^{er} día, y se determinaron los resultados y se registraron en el día 7^o-8^o. Se calculó el título de virus mediante el procedimiento de karber con el título de dilución máxima que permitió la ocurrencia de citopatía positiva en 50% de los poros de célula, como el punto final.

$$\text{Fórmula: } \text{LogTCID}_{50} = \text{XM} + \frac{1}{2} d - d \frac{\sum P_i}{100}$$

TCID₅₀: dosificación de infección de 50% de histocitos

XM: logaritmo de la dilución de más alta concentración de virus

25 d: logaritmo del coeficiente de dilución (múltiple);

∑pi: la suma de los porcentajes de citopatía para cada dilución;

(4) Impacto de los fármacos sobre la citopatía inducida por virus

30 Se succionó y descartó un medio de cultivo en placas cubierto con una monocapa de células, se inocularon las células en una cantidad de virus atacantes correspondiente a 100TCID₅₀, se realizó absorción en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂ por dos horas, y entonces se añadieron concentraciones específicas (aproximadamente la concentración máxima no citotóxica) de cada fluido de fármaco. Cada concentración fue ejecutada en sextuplicado en 6 poros con 200 µl/pocillo. La inyección de ribavirina y fosfato de oseltamivir sirvieron como grupos de control positivo mientras el grupo de control normal (sin virus ni fármaco) y grupo de control de virus (añadiendo virus pero no fármaco) fueron ajustados para examinar el efecto de los fármacos sobre CPE inducida por virus. Después de 72 horas, se midieron los valores OD bajo longitud de onda de 492 nm usando un procedimiento MTT colorimétrico, y se calculó la rata efectiva antiviral (ER%) de los fármacos. Se usó el procedimiento de análisis de varianza (ANOVA) en el software estadístico SPSS 18.0, para determinar si había diferencia significativa entre diferentes grupos de fármacos sobre la eficiencia antiviral.

40 ER% = (el promedio de valor OD del grupo tratado con fármaco - el promedio de valor OD del grupo de control de virus)/(el promedio de valor OD del grupo de control de célula - el promedio de valor OD del grupo de control de virus) x 100%

1.3 Resultados de ensayo

(1) TCID₅₀ de diferentes virus

$$\text{virus de parainfluenza: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 50}{100} = -4$$

$$\text{virus de influenza: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 50}{100} = -4$$

11

$$\text{CVB}_3: \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 100 + 50}{100} = -5$$

$$\text{HSV-1: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 100 + 30}{100} = -4.8$$

$$\text{AdV: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 50}{100} = -4$$

$$\text{RSV: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 100 + 50}{100} = -5$$

$$\text{CoxA16: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 100 + 50}{100} = -5$$

$$\text{EV71: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 100 + 50}{100} = -5$$

(2) Determinación de la toxicidad del fármaco

1) Determinación de la citotoxicidad de fármacos

5 Las concentraciones máximas no tóxicas (TC₀) y las concentraciones de toxicidad mediana (TC₅₀) de los fármacos sobre la célula Vero y las concentraciones del fármaco usado para el ensayo antiviral se mostraron en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2 Resultados de ensayo de citotoxicidad de fármaco (unidad: g/l)

Fármaco \ Virus	Ibuprofeno de filigenina	Ribavirina	Fosfato de oseltamivir	Filigenina
Concentración máxima no tóxica	0,109	0,065	0,28	0,011
Concentración mediana tóxica	0,485	1,392	0,832	0,297
0,30	0,3	0,70	0,30	0,02

2) Resultados de efectos protectores de fármacos sobre la citopatía inducida por virus

10 Para las ratas efectivas de los fármacos en resistencia a diferentes virus y resultados del análisis varianza de una vía del procedimiento ANOVA, véase la Tabla 3 para detalles.

Tabla 1-3 Tabla estadística de rata efectiva antiviral (ER%) de fármacos

Fármaco Virus	Ibuprofeno de filigenina	Ribavirina	Fosfato de oseltamivir	Filigenina	
Virus de influenza	99,95***	57,49*	81,76**	55,12*	75,35**
Virus de parainfluenza	100,00***	81,56**	94,52**	65,96*	80,72**
CoxA16	75,89***	0,70	2,95	1,35	50,04
RSV	87,74***	50,08*	37,60	52,33*	80,88**
HSV-1	99,80***	60,92*	66,56**	62,10*	84,30**
ADV	75,90***	0,43	10,31	5,07	50,61

EV71	99,81***	4,25	51,86	9,88	75,86**
CVB ₃	75,83***	13,44	1,64	15,02	50,89

Nota: comparado con el grupo de control de virus, *P<0,05, **P<0,01; comparado con filigenina, #P<0,05, ##P<0,01.

- 5 Como se muestra en la tabla 1-3, tanto la rata inhibidora y como la rata efectiva de éster de ibuprofeno de filigenina sobre el virus de influenza, el virus de parainfluenza, el virus tipo I de Herpes Simplex (HSV-I) y el enterovirus EV71 son mayores de 99% con diferencias distintivas comparadas con el grupo de control de virus, y son estadísticamente significativas. La eficacia antiviral de éster de ibuprofeno de filigenina sobre diferentes virus fue superior a la de filigenina, ribavirina y fosfato de oseltamivir.

2. Ensayo antiviral *in vivo*

10 2.1 Materiales de ensayo

(1) animales de ensayo

Los ratones Kunming, Medicinal Animal No. 10-5219, fueron suministrados por el Ezperimental Animal Center de the Norman Betune Science center de Jilin University.

(2) Instrumentos de detección y reactivos

Nombre del instrumento	Modelo	Fabricante
Instrumento de PCR cuantitativa	7300	ABI
PCR INSTRUMENT	ES-60J	Electronic Analytical Balance
Balanza analítica electrónica	FA1004	Shenyang Longteng Co., Ltd.
Incubadora de CO ₂	HG303-5	Nanjing Experimental Instrument Factory
Banco superlimpio	SW-CJ-IF	Suzhou Antai Technology Co., Ltd.
Microscopio invertido	CKX41	Olympus Instrument
Congelador de temperatura ultrabaja -80 °C	TECON-5082	Australia
Oscilador de baño de agua	HZS-H	Harbin Donglian Co., Ltd.
Lector de microplacas	TECAN 5082	A- Australia
Espectrofotómetro	Model 7550	Japón

2.2 Procedimiento de ensayo

(1) Determinación de la dosis de letalidad mediana de los ratones debida al virus de influenza y virus de parainfluenza

5 El virus de influenza y el virus de parainfluenza (lisado celular) fueron diluidos mediante un descenso de 10 veces hasta líquidos de virus con concentraciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , y 10^{-5} . Se adoptaron 120 ratones Kunming, 60 de los cuales fueron suministrados para el grupo de virus de influenza y los restantes 60 fueron suministrados para el grupo de virus de parainfluenza, y fueron divididos aleatoriamente en 6 grupos separadamente; los ratones fueron ligeramente anestesiados con éter, y fueron infectados por vía nasal con líquidos de virus que tenían diferentes diluciones, a 0,03 ml/ratón. Entretanto se ajustó el control de blanco, y el líquido de virus fue reemplazado con solución salina. Se usaron la muerte y supervivencia como los índices de observación, y se ejecutó observación cada día hasta 14 días después de la infección. Aquellos que murieron dentro de las 24 horas de infección fueron muerte no específica y no fueron contados, y el líquido de virus LD₅₀ fue calculado usando el procedimiento de Karber. Fórmula de cálculo:

15
$$\text{LogLD}_{50} = \text{XM} + \frac{1}{2} d - d \frac{\sum P_i}{100}$$
 [en la que: LD₅₀: dosificación letal mediana; XM: logaritmo de la más alta dilución de concentración de virus; d: logaritmo del coeficiente de dilución (múltiple); $\sum p_i$: la suma de cada porcentaje de citopatía de dilución].

(2) Investigación de la resistencia del éster de ibuprofeno de filigenina a la neumonía causada por infección por antivirus de influenza y virus de parainfluenza

1) Animales de ensayo y división de grupos

20 Se adoptaron 840 ratones Kunming con una edad de cuatro semanas, para ejecutar dos pruebas. Se adoptaron 420 ratones y se dividieron aleatoriamente en 21 grupos (20 para cada grupo) para ensayo de determinación de índice pulmonar y la rata inhibitoria del índice pulmonar de éster de ibuprofeno de filigenina para los ratones infectados por el virus de influenza; el ensayo fue repetido por 3 veces, 70 ratones cada tiempo. Adicionalmente, se adoptaron 420 ratones y se dividieron aleatoriamente en 21 grupos (20 para cada grupo) para la determinación de determinar el título de hemaglutinación de suspensión pulmonar de virus de éster de ibuprofeno de filigenina; el ensayo fue repetido por 3 veces, 70 ratones cada tiempo.

2) Procedimiento de infección

30 Se colocó un algodón para desengrasar en un vaso de precipitados de 200-300 ml, y se le añadió una cantidad adecuada de dietil éter (sólo para humedecer el algodón). Se invirtió de abajo hacia arriba el vaso de precipitados que contenía el algodón para desengrasar, los ratones estaban extremadamente excitados cuando se anestesiaron allí, y se les hizo descansar sobre su espalda cuando estaban claramente débiles, los ratones fueron infectados por vía nasal con 15LD₅₀ de virus de influenza y virus de parainfluenza a 0.03 ml/fosa nasal, y la suspensión de virus fue reemplazada con solución salina normal en el grupo de control normal.

3) Procedimiento de administración y dosificación de administración

35 A los ratones se administró por vía intragástrica el grupo de éster de ibuprofeno de filigenina, ribavirina y fosfato de oseltamivir, antes del día en que fueron infectados. Las dosificaciones alta, media y baja de administración de éster de ibuprofeno de filigenina fueron 13,0, 8,0, y 4,0 mg/kg respectivamente, la dosificación de administración de la ribavirina fue 58,5 mg/kg, una vez al día por 5 días consecutivos, y a los ratones en el grupo de control de virus se les administró solución salina normal del mismo volumen.

40 4) Índice observacional

① Determinación de índice pulmonar

45 En el quinto día después de la administración de fármacos a los ratones, se evitó que los ratones bebieran agua por 8 horas primero; entonces, después de haber pesado los ratones, se retiraron sus ojos y dichos animales fueron sacrificados mediante exsanguinación a través de los núcleos vacíos de los ojos; entonces se retiraron los pulmones después de abrir el pecho, se lavaron dos veces con solución salina normal seguida por el retiro de la humedad de la superficie con un papel de filtro, y se pesaron usando una balanza electrónica. El índice pulmonar y la rata inhibitoria del índice pulmonar son calculados de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

50 Índice pulmonar = (peso del pulmón de un ratón/peso corporal del ratón) x 100 %; la rata inhibitoria del índice pulmonar = (promedio de índice pulmonar del grupo de modelo infección - promedio de índice del grupo de ensayo)/promedio de índice pulmonar del grupo de modelo infección x 100 %

② Determinación del título de hemaglutinación de suspensión pulmonar de virus

El quinto día después del tratamiento se recogieron respectivamente diferentes grupos de pulmones de ratones, y en un homogeneizador a baja temperatura se molieron hasta dar un producto homogéneo; el producto homogéneo fue diluido hasta suspensión de tejido pulmonar al 10%, con solución salina normal; se ejecutó centrifugación para obtener un sobrenadante, al cual se aplicó doble dilución y entonces se hizo gotear sobre una placa de titulación con 0,2 ml/pocillo; se añadió a cada pocillo 0,2 ml de una suspensión de eritrocitos de pollo al 1%, y se mezcló bien; se colocó la placa de titulación en una sala a temperatura ambiente por 30 minutos para observar y registrar los títulos de hemaglutinación. El punto final aparece cuando el eritrocito ha aglutinado (++), y su título es expresado por la dilución múltiple de suspensión.

③ Observación histomorfológica de pulmón

El día 5 después del tratamiento, se recogieron los pulmones de ratón en cada grupo, y a simple vista se observan los cambios patológicos generales de sus vísceras, y se registran. Los pulmones fueron lavados con solución salina normal y se aspiró la humedad sobre ellos usando papel de filtro, se fijó una parte del pulmón con formaldehído 10% y se incrustó con parafina y se tajó, y se tiñeron con HE las tajadas de tejido de pulmón, seguido por observación y fotografía bajo un microscopio.

2.3 Resultados de ensayo y análisis

(1) Resultado de la dosificación letal mediana de los ratones de vida al virus de influenza el virus de parainfluenza

Se infectaron respectivamente por vía nasal ratones Kunming en los grupos de ensayo, con 30 µl de los líquidos de virus de influenza y virus de parainfluenza de diferentes concentraciones; al tercer día de infección, todos los ratones en los primeros tres grupos (grupo 10⁻¹, grupo 10⁻² y grupo 10⁻³ sobre la base de concentraciones de virus) experimentaron síntomas de enfermedad de diferentes grados: pelaje pilomotor, temblor, reducción en el apetito y así; el quinto día, los ratones tropezaban; en el sexto día, los ratones en el grupo de la concentración más alta de virus concentración (grupo 10⁻¹) comenzaron a morir, y la muerte ocurrió sucesivamente en los grupos restantes, al séptimo día de infección. Una vez estuvo completa la observación de 14 días, se contó la mortalidad de los ratones de cada grupo, y los resultados se muestran en la Tabla 1-4 y Tabla 1-5 abajo. Por cálculo, LD₅₀ del virus de influenza fue una dilución de 10^{-2,9}, y LD₅₀ del virus de parainfluenza fue una dilución de 10^{-2,5}.

Tabla 1-4 Los resultados de ensayo de dosificación letal mediana del virus de influenza

Grupo de virus de influenza	Mortalidad acumulada	Supervivencia acumulada	Rata de mortalidad acumulada
Grupo 10 ⁻¹	9	1	90%
Grupo 10 ⁻²	7	3	70%
Grupo 10 ⁻³	4	6	40%
Grupo 10 ⁻⁴	3	7	30%
Grupo 10 ⁻⁵	1	9	10%
Grupo blanco	0	10	0%

Los valores LD₅₀ de los virus fueron calculados por el procedimiento Karber. El valor LogLD₅₀ del virus de influenza fue como sigue:

$$\text{LogLD}_{50} = X_M + \frac{1}{2} d - d \frac{\sum F_i}{100} = -1 + 0,5 - (80\% + 50\% + 40\% + 20\% + 0\% + 0\%) = -2,9$$

Tabla 1-5 Los resultados de ensayo de la dosificación letal mediana del virus de parainfluenza

Grupo de virus de influenza	Mortalidad acumulada	Supervivencia acumulada	Rata de mortalidad acumulada
Grupo 10 ⁻¹	8	2	80%
Grupo 10 ⁻²	6	4	60%
Grupo 10 ⁻³	4	6	40%
Grupo 10 ⁻⁴	2	8	20%
Grupo 10 ⁻⁵	0	10	0%
Grupo blanco	0	10	0%

Los valores LD₅₀ de virus fueron calculados por el procedimiento Karber. El valor LogLD₅₀ del virus de parainfluenza fue como sigue:

$$\text{LogLD}_{50} = X_M + \frac{1}{2} d - d \frac{\sum P_i}{100} = -1 + 0,5 \cdot (90\% + 70\% + 40\% + 30\% + 10\% + 0\%) = -2,5$$

5 (2) Resultados de éster de ibuprofeno de filigenina sobre la resistencia a neumonía causada por infecciones con el virus de influenza y el virus de parainfluenza.

① Determinación del índice pulmonar

10 Una vez los ratones fueron infectados con el virus de influenza y el virus de parainfluenza, el promedio de índice pulmonar mostró que: comparado con el grupo de modelo de infección, el éster de ibuprofeno de filigenina tuvo cierto efecto protector en el intervalo de concentración de 3,25-13,0 mg/kg/d, y obviamente descendieron todos los índices pulmonares; los efectos terapéuticos del grupo de dosificaciones elevadas de éster de ibuprofeno de filigenina contra el virus de influenza y el virus de parainfluenza fueron mucho mejores que para el grupo de filigenina (P < 0,05). Los resultados pudieron verse en las Tablas 1-6 y 1-7.

15 Tabla 1-6 Impacto del éster de ibuprofeno de filigenina sobre el índice pulmonar y la rata de inhibición del índice pulmonar de ratones infectados con virus de influenza (n=3)

Grupos	Dosificación de fármaco (mg/kg/d)	Índice pulmonar (x ±S)	Rata inhibidora de índice pulmonar (%)	Valor P
Grupo de control normal	0	1,274±0,102	-	
Grupo de control de virus	0	1,488±0,084	-	
Grupo de ribavirina	58,5	1,281±0,061	13,90	*<0,05
Grupo de fosfato de oseltamivir	19,5	1,178±0,066	19,84	*<0,01
Grupo de filigenina	13,0	1,302±0,046	12,51	*<0,05

(continuación)

Grupos		Dosificación de fármaco (mg/kg/d)	Índice pulmonar (x ±S)	Rata inhibidora de índice pulmonar (%)	Valor P
Éster de ibuprofeno de filigenina	Grupo de alta dosificación	13,0	1,147±0,048	22,94	*<0,01, #<0,05
	Grupo de dosificación media	8,0	1,190±0,061	20,05	*<0,01, #<0,05
	Grupo de dosificación baja	4,0	1,222±0,040	17,90	*<0,05, >0,05

Comparado con grupo de control de virus, *P<0,05, **P0,01; comparado con el grupo de filigenina, #P<0,05, ##P0,01

Tabla 1-7 Impacto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre el índice pulmonar y la rata de inhibición del índice pulmonar de ratones infectados con virus de parainfluenza (n = 3)

Grupos		Dosificación de fármaco (mg/kg/d)	Índice pulmonar (x ±S)	Rata inhibidora de índice pulmonar (%)	Valor P
Grupo de control normal		0	1,305±0,039	-	
Grupo de control de virus		0	1,591±0,065	-	
Grupo de ribavirina		58,5	1,340±0,069	15,76	*<0,01
Grupo de fosfato de oseltamivir		19,5	1,243±0,052	21,85	*<0,01
Grupo de filigenina		13,0	1,357±0,050	14,69	*<0,01
Éster de ibuprofeno de filigenina	Grupo de alta dosificación	13,0	1,237±0,070	22,25	*<0,01, #<0,05
	Grupo de dosificación media	6,5	1,275±0,061	19,89	*<0,01, #<0,05
	Grupo de dosificación baja	3,25	1,320±0,053	17,01	*<0,01, >0,05

Comparado con grupo de control de virus, *P<0,05, **P0,01; comparado con el grupo de filigenina, #P<0,05, ##P0,01

5

②Determinación del título de hemaglutinación de virus de suspensiones de pulmón

Una vez los ratones son infectados con el virus de influenza y the virus de parainfluenza, los títulos de hemaglutinación de virus (InX) de tejidos de pulmón del grupo modelo de infección fueron 32,40 y 33,11, respectivamente, después del tratamiento con éster de ibuprofeno de filigenina de diferentes concentraciones por 5

5 días, ambos títulos de hemaglutinación de virus de tejidos de pulmón descendieron en alguna extensión y, comparado con el grupo de modelo de infección, la diferencia fue significativa ($P < 0,01$); allí, los títulos de hemaglutinación de virus de influenza y de parainfluenza de los grupos de dosificación alta y de dosificación media de éster de ibuprofeno de filigenina, fueron ambos significativamente menores que aquellos del grupo modelo, y las ratas de inhibición fueron ambas mayores que las del grupo de filigenina, con diferencias significativas ($P < 0,05$, $p < 0,01$). Los resultados del ensayo pueden ser vistos en las Tablas 1-8 y 1-9,

Tabla 1-8 Efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre títulos de hemaglutinación de suspensiones de pulmón de ratones infectados con el virus de influenza

Grupos		Dosificación de fármaco (mg/kg/d)	Título de hemaglutinación (lnX)	Rata de inhibición (%)	Valor P
Grupo de control normal		0	0		
Grupo de control de virus		0	32,40±1,105		
Grupo de ribavirina		58,5	21,91±1,050	32,39	**<0,01
Grupo de fosfato de oseltamivir		19,5	20,50±1,122	36,73	**<0,01
Grupo de filigenina		13,0	22,61±1,059	30,22	**<0,01
Éster de ibuprofeno de filigenina	Grupo de alta dosificación	13,0	19,32±0,624	40,36	**<0,01, ##<0,01
	Grupo de dosificación media	6,5	20,50±0,431	36,72	**<0,01, #<0,05
	Grupo de dosificación baja	3,25	22,01±1,420	32,07	**<0,01, >0,05
Comparado con el grupo de control de virus, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; comparado con el grupo de filigenina, # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$.					

10 Tabla 1-9 Efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre títulos de hemaglutinación de suspensiones de pulmón de los ratones infectados con virus de parainfluenza (n=3)

Grupo	Dosificación de fármaco (mg/kg/d)	Título de hemaglutinación (lnX)	Rata de inhibición (%)	Valor P
Grupo de control normal	0	0		
Grupo de control de virus	0	33,11±1,210		

(continuación)

Grupo	Dosificación de fármaco (mg/kg/d)	Título de hemaglutinación (InX)	Rata de inhibición (%)	Valor P	
Grupo de ribavirina	58,5	23,22±1,091	24,53	*<0,01	
Grupo de fosfato de oseltamivir	19,5	22,05±1,055	33,44	*<0,01	
Grupo de filigenina	13,0	23,79±1,072	28,15	*<0,01	
	Grupo de alta dosificación	13,0	19,75±0,902	40,34	*<0,01, #<0,01
Éster de ibuprofeno de filigenina	Grupo de dosificación media	6,5	20,75±0,598	37,33	*<0,01, #<0,05
	Grupo de dosificación baja	3,25	21,55±0,857	34,90	*<0,01, >0,05

Comparado con el grupo de control de virus, *P<0,05, **P<0,01; comparado con el grupo de filigenina, #P<0,05, ##P<0,01,

③ Resultados de detección de histología pulmonar

5 Pudo verse microscópicamente en el grupo de modelo de neumonía viral, que: el pulmón intersticial, tal como
 10 bronquios, bronquiolos y paredes alveolares de los ratones de los grupos modelo de neumonía inducida por virus de influenza y virus de parainfluenza sufrieron de congestión, edema, e infiltración de linfocitos, infiltración celular mononuclear, ensanchamiento de la pared alveolar, y reacción inflamatoria de alveolos pulmonares. En los grupos de dosificación alta y dosificación media de éster de ibuprofeno de filigenina, las lesiones pulmonares de los ratones se aliviaron de manera significativa y la estructura morfológica del pulmón fue parcialmente normal. Los cuadros patológicos pueden ser vistos en detalle en los dibujos.

15 Los resultados de examen microscópico de tajadas de tejido patológico de pulmón de ratón del modelo de neumonía por virus de influenza son mostrados en la Fig. 4; la Fig. A muestra el tejido pulmonar de un ratón normal; la Fig. B muestra el tejido pulmonar de un ratón con neumonía por virus de influenza; la Fig. C muestra el tejido pulmonar del ratón del modelo de ratón con neumonía por virus de influenza, después de ser tratado con la dosificación elevada de éster de ibuprofeno de filigenina; la Fig. D muestra el tejido pulmonar del ratón del modelo de ratón con neumonía por virus de influenza, después de ser tratado con la dosificación mediana de éster de ibuprofeno de filigenina; la Fig. E muestra el tejido pulmonar del ratón del modelo de ratón con neumonía por virus de influenza después de ser tratado con la dosificación baja de éster de ibuprofeno de filigenina;

20 La Fig. F muestra el tejido pulmonar del ratón del modelo de ratón con neumonía por virus de influenza, después de ser tratado con Tamiflu.

2.4 Conclusiones

25 Los resultados del ensayo antiviral *in vivo* mostraron que el éster de ibuprofeno de filigenina en el intervalo de dosificación de 3,25-13 mg/kg/d tiene efectos de inhibición relativamente significativos sobre el virus de influenza y virus de parainfluenza, y que en la neumonía viral de ratón causada de este modo, en un intervalo de dosificación de 3,25 mg/kg/d a 13 mg/kg/d puede reducir de manera significativa el índice pulmonar y el título de hemaglutinación del mismo, por consiguiente mejorar significativamente la patología de tejido pulmonar, y tiene diferencia significativa comparada con el grupo de control del modelo, y los efectos terapéuticos de los grupos de dosificación media y dosificación elevada de éster de ibuprofeno de filigenina fueron obviamente mejores que el grupo de filigenina (*P<0,05 o **P<0,01), y también mostraron una tendencia de ser mejores que los grupos de
 30 ribavirina y de fosfato de oseltamivir.

Ejemplo 2 de ensayo: ensayo de efectos antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios de éster de ibuprofeno de filigenina

1.1 Materiales de ensayo

(1) Animales de ensayo:

5 Ratas Wistar, peso corporal: 120-250 g, combinación de machos y hembras, certificado No: Medicinal Animal No. 10-5219; conejos japoneses blancos, machos, peso corporal: 1.5-2,0 kg. certificado No.: Medicinal Animal No. 10-5115, todos suministrados por Changchun Gaoxin Medical Animal Experimental Center, alimentos animales suministrados por el Experimental Animal Department de Jilin University.

(2) Fármaco de ensayo:

10 Ester de ibuprofeno de filigenina: un sólido blanco (preparado en ejemplo 1), producido por Dalian Fusheng Natural Medicine Development Co., Ltd., con una pureza de 99,1% según se determinó mediante cromatografía líquida de alto desempeño equipada con detector UV y detector evaporativo de dispersión de luz, mediante el procedimiento de normalización de área. Cuando se usó para el ensayo fue preparado en la concentración deseada con 0,5% de carboximetilcelulosa de sodio.

1.2 Principales equipos y reactivos

15 Instrumento de medición hinchamiento de la punta del pie de rata ILS-: Equipment Station, Shandong Academy of Medical Services;
Espectrofotómetro visible 722: manufacturado por Shanghai Spectrum Instruments Co., Ltd.;
Termodetector digital portátil: modelo WSC-411P, the Third Factory of Pudong, Shanghai;
Pilocarpina: Tianjin People's Pharmaceutical Factory, número de lote: 20130112;
20 Histamina: Shanghai Institute of Biochemistry, número de lote: 20130115;
5-Hiroxitriptamina: Shanghai Institute of Biochemistry, número de lote: 20130623;
Evans blue: Shanghai Chemical Reagent Procurement y Supply Station, número de lote: 20130217;
Clorfeniramina maleato comprimido: Changchun Economic Development Zone Pharmaceutical Co., Ltd., número de lote: 20130801;
25 Carragenina: Jilin Drug Research Institute, número de lote: 20130502;
Paracetamol comprimido: Liaoyuan Baikang Pharmaceutical Co., Ltd., número de lote: 20130512;
Aspirina comprimido: Baicheng Wanda Pharmaceutical Co., Ltd., número de lote: 20130305;
Levadura de cerveza: Beijing AOBX Biotechnology Co., Ltd., número de lote: 2013020;
Vacunas tifoide y paratifoide: Changchun Institute of Biological Products, número de lote: 20130216.

1.3 Proceso estadístico

30 El análisis estadístico aplica el ensayo de suma de rango, ensayo X^2 y ensayo t con comparación de dos muestras.

2.1 Ensayo de efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre la secreción de sudor de parte de pata de rata (procedimiento de coloración)

(1) Material y procedimiento

35 Este ensayo fue diseñado para observar el cambio de secreción de sudor, basado en el mecanismo según el cual la glándula sudorípara está distribuida sobre las almohadillas de la pata de rata, y el yodo y almidón pueden tener reacción púrpura cuando se encuentran con sudor.

40 En el ensayo, se seleccionaron 350 ratas Wistar, con igual número de machos y hembras, pesando 120-150 g. Tales ratas fueron divididas aleatoriamente en 35 grupos por peso y género, es decir 5 grupos para el grupo de control (0,5% de carboximetilcelulosa), cinco grupos para cada dosificación de los 2,5, 5, y 10mg/kg de éster de ibuprofeno de filigenina, cinco grupos para ibuprofeno (300mg/kg), cinco grupos para filigenina (10mg/kg) y cinco grupos para fármaco pilocarpina positivo (35mg/kg), con 10 ratas para cada grupo. Las ratas fueron colocadas en una bolsa de fijación de rata hecha en casa, con los extremos posteriores dobles expuestos. Con el hisopo de algodón empapado en etanol anhidro se frotó suavemente la suciedad de la pata derecha, para limpiarla. Aparte de que se usó inyección subcutánea para la solución de pilocarpina, para todos los otros grupos se usó administración intragástrica. Una hora después de la administración (30 min después de la administración del grupo de pilocarpina), el sudor original en la pata derecha de la rata de cada grupo y el sudor causado por el esfuerzo fueron primero que todo enjugados con hisopo de algodón seco, y recubiertos con el reactivo líquido A de Hetian-Gao Yuan A (se tomaron 2 g de yodo para disolverlos en 100 ml de etanol anhidro), y entonces, después de ser completamente seco, se recubrió una delgada capa de reactivo líquido B de Hetian-Gao Yuan (se tomaron 50 g de almidón soluble y 100 ml de aceite de ricino y se mezclaron uniformemente). Después de recubrir el líquido B por 1, 5, 10, 15 y 20 min respectivamente, se usó un vidrio de magnificación para observar cuidadosamente el color y número de puntos con color púrpura oscuro (es decir, puntos de sudor). Cuando se completó el ensayo, se

llevó a cabo el proceso estadístico de acuerdo con el ensayo de suma de rangos con comparación de dos muestras, con objeto de comparar la diferencia entre los grupos.

(2) Resultado

5 Comparado con el grupo de control, se observó un obvio efecto promotor para el grupo de éster de ibuprofeno de filigenina de 10 mg/kg, sobre la secreción de sudor de la parte de pata de rata después de cubrir con el líquido B por 5, 10, 15 y 20 min (*P<0,05), y tuvo el efecto característico de promover la secreción de sudor de la parte de pata de rata, lo cual fue equivalente para el fármaco pilocarpina positivo; allí, el éster de ibuprofeno de filigenina de dosificaciones alta, media y baja mostró efecto significativo sobre la promoción de la secreción de sudor de la pata de rata, después de 5 a 20 minutos, 10 a 20 minutos, y 20 minutos de la administración, respectivamente; el éster de ibuprofeno de filigenina de dosificaciones alta y media tuvo un mejor efecto terapéutico para promover el sudor después de 5 a 20 minutos y 10 a 15 minutos de la administración comparado con la filigenina (#P<0.05), mientras la dosificación elevada tuvo un mejor efecto terapéutico para promover el sudor después de 20 minutos de la administración, comparado con ibuprofeno. Véanse las Tablas 2-1, 2-2, 2-3, 2-4 y 2-5.

15 Tabla 2-1 Ensayo del efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre la secreción de sudor de la parte de pata de rata (procedimiento de coloración)

Grupos	Número de animales	Número de animales de puntos de sudor de cada nivel después de recubrir con líquido B por 1 minuto					Valor P
		-	+	++	+++	++++	
Grupo de control	10	2	2	3	2	1	>0,05
Grupo de ibuprofeno 300,0mg/kg	10	0	1	3	1	5	>0,05
Grupo de filigenina							
10,0mg/kg	10	0	3	3	1	3	>0,05
Pilocarpine							
35,0mg/kg	10	0	1	3	1	5	>0,05
Éster de ibuprofeno de filigenina							
2,5mg/kg	10	0	2	3	3	2	>0,05
5,0mg/kg	10	0	1	2	3	4	>0,05
10,0mg/kg	10	0	1	3	1	5	>0,05

20 Tabla 2-2 Ensayo de efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre la secreción de sudor de parte de pata de rata (procedimiento de coloración)

ES 2 736 604 T3

Grupos	Número de animales	Número de animales de puntos de sudor de cada nivel después de recubrir con líquido B por 5 minutos					Valor P
		-	+	++	+++	++++	
Grupo de control	10	0	4	1	4	1	>0,05
Grupo de ibuprofeno							
300,0mg/kg	10	0	2	1	2	5	<0,05
Filigenina							
10,0mg/kg	10	0	3	2	2	3	>0,05
Pilocarpina							
35,0mg/kg	10	0	1	2	1	6	<0,05
Éster de ibuprofeno de filigenina							
2,5mg/kg	10	0	1	3	3	3	>0,05
5,0mg/kg	10	0	1	4	1	5	>0,05
10,0mg/kg	10	0	0	3	2	5	*<0,05, #<0,05

Tabla 2-3 Ensayo de efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre la secreción de sudor de parte de pata de rata normal (procedimiento de coloración)

Grupos	Número de animales	Número de animales de puntos de sudor de cada nivel después de recubrir con líquido B por 10 minutos					Valor P
		-	+	++	+++	++++	
Grupo de control	10	0	3	2	4	1	>0,05
Grupo de ibuprofeno							
300,0mg/kg	10	0	1	2	2	5	<0,05
Filigenina							
10,0mg/kg	10	0	1	3	3	3	>0,05
Pilocarpina							

ES 2 736 604 T3

Grupos	Número de animales	Número de animales de puntos de sudor de cada nivel después de recubrir con líquido B por 10 minutos					Valor P
		-	+	++	+++	++++	
35,0mg/kg	10	0	1	2	1	6	<0,05

(continuación)

Grupos	Número de animales	Número de animales de puntos de sudor de cada nivel después de recubrir con líquido B por 10 minutos					Valor P
		-	+	++	+++	++++	
Éster de ibuprofeno de filigenina							
2,5mg/kg	10	0	1	2	3	4	>0,05
5,0mg/kg	10	0	0	3	2	5	**<0,05
10,0mg/kg	10	0	0	2	3	5	**<0,05

Tabla 2-4 Ensayo de efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre la secreción de the sudor de parte de pata de rata normal (procedimiento de coloración)

Grupos	Número de animales	Número de animales de puntos de sudor de cada nivel después de recubrir con líquido B por 15 minutos					Valor P
		-	+	++	+++	++++	
Grupo de control	10	0	3	2	4	1	>0,05
Grupo de ibuprofeno							
300,0mg/kg	10	0	1	2	2	5	<0,05
Filigenina							
10,0mg/kg	10	0	1	2	3	4	>0,05
Pilocarpina							
35,0mg/kg	9	0	0	2	1	6	<0,05
Éster de ibuprofeno de filigenina							
2,5mg/kg	10	0	1	3	1	5	>0,05
5,0mg/kg	10	0	0	2	3	5	**<0,05

ES 2 736 604 T3

Grupos	Número de animales	Número de animales de puntos de sudor de cada nivel después de recubrir con líquido B por 15 minutos					Valor P
		-	+	++	+++	++++	
10,0mg/kg	10	0	0	1	4	5	**<0,05

Tabla 2-5 Ensayo de efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre la secreción de parte de pata de rata (procedimiento de coloración)

Grupos	Número de animales	Número de animales de puntos de sudor de cada nivel después de recubrir con líquido B por 15 minutos					Valor P
		-	+	++	+++	++++	
Grupo de control	10	0	3	2	4	1	>0,05
Grupo de ibuprofeno (300,0mg/kg)	10	0	1	2	2	5	<0,05
Filigenina 10,0mg/kg)	10	0	1	2	2	5	>0,05
Pilocarpina (35,0mg/kg)	9	0	0	2	1	6	<0,05
Éster de ibuprofeno de filigenina							
2,5mg/kg	10	0	0	2	3	5	<0,05
5,0mg/kg	10	0	0	1	4	5	<0,05
10,0mg/kg	10	0	0	0	5	5	**▲<0,05

Estándar de evaluación de nivel de puntos de sudor:

"-" sin punto de sudor sobre la superficie de la almohadilla de pata de rata;

"+" punto de sudor observado ocasionalmente sobre la superficie de la almohadilla de pata de rata, con área de sudor inferior a aproximadamente 10% de la superficie de la pata;

"++" puntos de sudor dispersos sobre la superficie de la almohadilla de pata de rata, con área de sudor de aproximadamente 11-40% de la superficie de la pata;

"+++ " puntos de sudor dispersos sobre la superficie de la almohadilla de pata de rata, con área de sudor de aproximadamente 41-70% de la superficie de la pata;

"++++" puntos de sudor distribuidos homogéneamente sobre la superficie de la almohadilla de pata de rata, con área de sudor superior a 71% de la superficie de la pata. Comparación entre cada grupo de ensayo y el grupo de control, *P<0,05; comparación entre éster de ibuprofeno de filigenina y filigenina, #P<0,05. Comparación entre éster de ibuprofeno de filigenina y ibuprofeno, ▲P<0,05.

2.2 Ensayo de efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre la secreción de sudor de parte de pata de rata (procedimiento de observación de morfología de tejido)

(1) Procedimiento y material

5 Este ensayo se basó en el mecanismo según el cual cuando la glándula sudorípara se excita, adicionalmente al incremento en la secreción de sudor, cambia también la morfología de la célula epitelial de la glándula sudorípara. El aumento en el número y la expansión de células vacías de las células epiteliales de la glándula sudorípara puede ser visto bajo el microscopio óptico. Tal vacuola agrandada presenta mitocondrial en hinchamiento, ruptura, fusión y agrandamiento de la vesícula secretora de células epiteliales de glándula sudorípara bajo el microscopio
10 electrónico, y mediante la observación morfológica de la célula epitelial de la glándula sudorípara en la parte de pata de rata, puede conocerse la actividad secretora de la glándula sudorípara.

En el ensayo, se seleccionaron 70 ratas Wistar, con igual número de machos y hembras, pesando 120-160 g. Tales ratas fueron divididas aleatoriamente en 7 grupos por peso y género, es decir el grupo de control de blanco (0,5% carboximetilcelulosa), los grupos de 2,5, 5, y 10 mg/kg de éster de ibuprofeno de filigenina, el grupo de
15 ibuprofeno (300 mg/kg), el grupo de filigenina (10 mg/kg) y el grupo positivo de fármaco pilocarpina (35 mg/kg), con 10 ratas para cada grupo. Aparte de la inyección subcutánea usada para la solución de pilocarpina, se usó administración intragástrica para todos los otros grupos. Una hora después de la administración de éster de ibuprofeno de filigenina (30 min después de la administración de pilocarpina), se cortó instantáneamente la
20 extremidad posterior derecha en la articulación del tobillo para retirar inmediatamente la almohadilla de la extremidad posterior derecha y se colocó en una solución de formaldehído al 10%, y se usó el procedimiento convencional para la fijación, deshidratación, incorporación, tajado y tinción HE. Se observó el cambio en las células epiteliales de la glándula sudorípara en la parte extrema de la rata de cada grupo, bajo el microscopio óptico, para observar principalmente la tasa de ocurrencia de vacuolas (es decir fracción vacía, porcentaje de
25 ocurrencia de vacuola = número de glándulas sudoríparas de vacuola/número de glándulas sudoríparas observadas × 100%), y se comparó la diferencia entre los grupos a través de ensayo X^2 para análisis estadístico.

(2) Resultado

Comparado con el grupo de control, se observó un obvio efecto promotor sobre la secreción de sudor de la parte extrema de la rata por los grupos de éster de ibuprofeno de filigenina de 5 y 10 mg/kg ($p < 0,01$ o $p < 0,001$), véase la Tabla 2-6.

30 Tabla 2-6 Ensayo de efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre la secreción de sudor de parte extrema de rata (procedimiento de observación de la morfología de tejido)

Grupos	Número de animales	Número de glándulas sudoríparas observadas	Número de glándulas sudoríparas vacuola	Fracción de vacía (%)
Grupo de control	10	242	14	5,78
Ibuprofeno (300,0mg/kg)	10	208	57	27,40***
Filigenina (10,0mg/kg)	10	211	23	10.90
Pilocarpina (35,0mg/kg)	10	208	57	27.40***
Éster de ibuprofeno de filigenina				
2,5mg/kg	10	236	20	8.47
5,0mg/kg	10	218	42	32.11***; #

Grupos	Número de animales	Número de glándulas sudoríparas observadas	Número de glándulas sudoríparas vacuola	Fración vacía (%)
10,0mg/kg	10	213	75	35.21***; ##

Comparado con el grupo de control, **p<0,01, ***p<0,001; comparado con el grupo de filigenina, #p<0,05, ##p<0,01,

2.3 Efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre la fiebre de rata inducida por levadura de cerveza

(1) Material y procedimiento

Se seleccionaron ratas Wistar pesando 180-200 g. Antes del ensayo, se usó un termómetro digital portátil WSC-411P para medir dos veces la temperatura rectal normal (con cierto intervalo para cada vez), y se tomó el promedio del valor de las dos mediciones, como la temperatura corporal normal de la rata. Entonces se escogieron 70 ratas con la temperatura corporal entre 36,5°C y 38°C, para dividir las aleatoriamente en 7 grupos por peso: el grupo modelo (0,5% de carboximetilcelulosa), los grupos de 2,5, 5, y 10 mg/kg de éster de ibuprofeno de filigenina, el grupo positivo de fármaco de paracetamol (100 mg/kg), el grupo de ibuprofeno (es decir grupo de control de profármaco, 300 mg/kg), el grupo de filigenina (100 mg/kg), con 10 ratas para cada grupo. Cada grupo de ratas fue sometido a inyección subcutánea en la espalda con suspensión fresca al 10% de levadura de cerveza de 10 ml/kg, para inducir la fiebre. Después de la administración de suspensión fresca al 10% de levadura de cerveza por 6,0 h, se sometieron a administración intragástrica de éster de ibuprofeno de filigenina y paracetamol, y al grupo de modelo se administró por vía intragástrica un volumen igual de carboximetilcelulosa al 0,5%. Se midió la temperatura rectal después de 1 h, 2 h, 3 h y 4 h de la administración respectivamente. Se observaron cambios en la temperatura corporal y se comparó la diferencia entre los grupos mediante procesamiento del ensayo t entre grupos, a través de porcentaje antipirético.

$$\text{Porcentaje antipirético} = \frac{\text{Temperatura corporal a un cierto tiempo después de la administración} - \text{Temperatura corporal a 6h después de la fiebre inducida}}{\text{Temperatura corporal a 6h después de la fiebre inducida}} \times 100\%$$

(2) Resultado

Después de la inyección subcutánea de suspensión fresca al 10% de levadura de cerveza en las ratas de cada grupo por 6 h, la temperatura corporal aumentó en aproximadamente 1,5°C, la cual era significativamente diferente de aquella antes de inducir la fiebre (p<0,001), indicando que el modelo de levadura de cerveza que causaba la fiebre de las ratas, fue establecido de manera exitosa. Comparado con el grupo modelo, los grupos de dosificación media y alta (5, 10 mg/kg) de éster de ibuprofeno de filigenina tuvieron efectos significativos de enfriamiento sobre la fiebre de rata inducida por la suspensión de levadura de cerveza después de 1 h, 2 h, 3 h y 4 h de la administración (p<0,05, o p<0,01, P<0,001); comparado con el grupo de filigenina e ibuprofeno, el grupo de dosificación elevada (10 mg/kg) de éster de ibuprofeno de filigenina tuvo un efecto de enfriamiento significativo sobre la fiebre de rata inducida por la suspensión de levadura de cerveza después de 1 h, 2 h, 3 h y 4 h de la administración, y el dicho efecto de enfriamiento significativo fue obviamente mejor que el de filigenina (p<0,01 o P<0,001) e ibuprofeno (p<0,05 o p<0,01); el grupo de dosificación media (5 mg/kg) de éster de ibuprofeno de filigenina tuvo efecto de enfriamiento significativo sobre la fiebre de rata inducida por suspensión de levadura de cerveza después de 1 h, 2 h, 3 h y 4 h de la administración, y el dicho efecto de enfriamiento fue obviamente mejor que el de filigenina (p<0,05 o p<0,01); el grupo de dosificación media (5 mg/kg) de éster de ibuprofeno de filigenina tuvo efecto significativo de enfriamiento sobre la fiebre de rata inducida por suspensión de levadura de cerveza después de 2 h, 3 h y 4 h de la administración, y el dicho efecto de enfriamiento fue obviamente mejor que el del grupo de ibuprofeno (p<0,05). Los resultados anteriores del ensayo mostraron que el efecto terapéutico de enfriamiento y antipirético del compuesto de éster de ibuprofeno de filigenina fue significativamente mejor que sus compuestos precursores de forsitasina e ibuprofeno; los resultados del ensayo anteriores pueden ser vistos en la Tabla 2-7.

2.4 Efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre la fiebre en conejo inducida por vacunas tifoide y paratifoide

(1) Material y procedimiento

Conejos japoneses blancos machos de oreja grande, pesando 1,5-2,0 kg, Antes del ensayo, se usó un termómetro digital portátil WSC-411P para medir dos veces la temperatura rectal normal (con ciertos intervalos para cada vez), y se tomó el promedio de valor como la temperatura corporal normal. Entonces se seleccionaron 48 conejos japoneses blancos de oreja grande con temperatura corporal de 38-39,6°C y se dividieron aleatoriamente en 8 grupos por peso, es decir: el grupo control de blanco (solución salina normal), el grupo control de modelo (carboximetilcelulosa 0,5%), el grupo de ibuprofeno (300 mg/kg), el grupo de filigenina (10 mg/kg), los grupos de 1,25, 2,5, y 5 mg/kg de éster de ibuprofeno de filigenina y el grupo positivo de fármaco paracetamol (50 mg/kg). Se fijaron entonces los conejos en un aparato fijador. Al grupo control de blanco se inyectó por vía intravenosa solución salina normal de 1 ml/kg a través del borde de la oreja; el grupo de control de modelo y los grupos de fármaco fueron inyectados por vía intravenosa con vacunas tifoide y paratifoide de 0,8 ml/kg a través del borde de la oreja. Cuando el aumento de temperatura corporal de los conejos fue mayor a 1°C (requiriendo aproximadamente 1-1,5 h, que estaba restringido a 1 h en este ensayo), al grupo de control de blanco y el grupo de modelo se administró por vía intragástrica carboximetilcelulosa 0,5% de 1 ml/kg, y a los grupos de fármaco se administró por vía intragástrica éster de ibuprofeno de filigenina y paracetamol. Se midió la temperatura rectal después de la administración por 30, 60, 90, 120, 180 y 240 min para observar los cambios en la temperatura corporal, y se comparó la diferencia entre los grupos mediante procesamiento de ensayo t entre los grupos, a través del porcentaje antipirético.

Temperatura corporal a un cierto tiempo después de la administración -
Temperatura corporal a 1h después de la fiebre inducida

$$\text{Porcentaje antipirético} = \frac{\text{Temperatura corporal a un cierto tiempo después de la administración} - \text{Temperatura corporal a 1h después de la fiebre inducida}}{\text{Temperatura corporal a 1h después de la fiebre inducida}} \times 100\%$$

(2) Resultado

Después de inyección intravenosa con las vacunas tifoide y paratifoide, a través del borde de la oreja de conejos por 1 h, el aumento de temperatura corporal fue aproximadamente 1 °C, lo cual indicó que las vacunas tifoide y paratifoide podrían ser usadas para preparar el modelo de fiebre de conejo. Comparada con el grupo de control de blanco, la temperatura corporal del grupo de modelo aumentó continuamente durante el período de observación de 300 min ($p < 0,05$ - $p < 0,001$); comparados con el grupo de modelo, los grupos de dosificación alta y media (5, 10 mg/kg) de éster de ibuprofeno de filigenina después de la administración por 30-240 min y el grupo de dosificación baja (5 mg/kg) después de la administración por 60-240 min tuvieron efecto antipirético significativo para fiebre de conejo inducida por las vacunas tifoide y paratifoide ($p < 0,05$ - $p < 0,001$); los grupos de dosificación alta y media (5, 10 mg/kg) de éster de ibuprofeno de filigenina después de la administración por 30-240 min y el grupo de dosificación baja (5 mg/kg) después de la administración por 60-240 min tuvieron efecto antipirético significativo sobre la fiebre de conejo inducida por las vacunas tifoide y paratifoide, el cual fue obviamente mejor que el del grupo del compuesto precursor de filigenina ($p < 0,05$ - $p < 0,001$); los grupos de dosificación alta y media (10 mg/kg) de éster de ibuprofeno de filigenina después de administración por 60-240 min tuvieron efecto antipirético significativo sobre la fiebre de conejo inducida por las vacunas tifoide y paratifoide, el cual fue obviamente mejor que el del grupo de ibuprofeno ($p < 0,05$ o $p < 0,01$); los resultados del ensayo anterior pueden ser vistos en la Tabla 2-8.

2.5 Ensayo de dolor analgésico de éster de ibuprofeno de filigenina

(1) Material y procedimiento

Se dividieron 72 ratones Kunming, aleatoriamente en 6 grupos, con 12 ratones por cada grupo. ① el grupo de control normal de blanco (es decir grupo de solución salina, 10 mg/kg); ② grupo positivo de fármaco aspirina (200 mg/kg); ③ grupo de ibuprofeno (300 mg/kg); ④ grupo de dosificación elevada de éster de ibuprofeno de filigenina (300 mg/kg); ⑤ grupo de dosificación media de éster de ibuprofeno de filigenina (150 mg/kg); ⑥ grupo de dosificación baja de éster de ibuprofeno de filigenina (75 mg/kg). Después de administrar el fármaco de cada grupo por vía gástrica durante 1 h, a los ratones se administró por vía intraperitoneal solución al 0,7% de ácido acético (10 ml/kg). Se registró el número de contorsiones de los ratones dentro de los 15 min después de la administración. El número de contorsiones fue tomado como el índice de evaluación para evaluar el efecto analgésico.

(2) Resultado

El efecto analgésico de éster de ibuprofeno de filigenina sobre el dolor inducido por ácido acético en ratones, puede ser visto en la Tabla 5. Comparando los grupos de dosificación baja, media y alta de éster de ibuprofeno de filigenina con el grupo de control de blanco (solución salina normal), se observó diferencia significativa ($P < 0,01$),

indicando que todos los grupos de diferente dosificación de éster de ibuprofeno de filigenina tuvieron efecto analgésico. Allí, el efecto terapéutico analgésico de dosificación elevada éster de ibuprofeno de filigenina fue sobresaliente, mejor que el del positivo de fármaco aspirina y el profármaco ibuprofeno; para detalles, véase la Tabla 2-9.

5 Tabla 2-9 Efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre dolor en ratones inducido por mal conteo

Grupos	Dosificación (mg/kg)	Tiempos de contorsión
Grupo de control de blanco	0	58,2
Grupo positivo de fármaco (aspirina)	200	5,0*
Profármaco (ibuprofeno)	300	9,7*

Grupos	Dosificación (mg/kg)	Tiempos de contorsión
Éster de ibuprofeno de filigenina		
Grupo de dosificación elevada	300	3,9 [#]
Grupo de dosificación media	150	6,5*
Grupo de dosificación baja	75	15,8*
Comparado con el grupo de control de blanco, *P<0,01; comparado con los grupos dosificación diferente de ibuprofeno, [#] P<0,01,		

2.6 Efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre el hinchamiento del extremo de rata inducido por carragenina

(1) Material y procedimiento

10 Se seleccionaron 70 ratas Wistar macho con peso corporal de 120-150 g, para ser divididas aleatoriamente en 7 grupos por peso, es decir: el grupo de control de blanco (carboximetilcelulosa 0,5%), los grupos de 2,5, 5, y 10 mg/kg de éster de ibuprofeno de filigenina, el grupo de profármaco ibuprofeno (300 mg/kg), el grupo de filigenina (10 mg/kg) y el grupo positivo de fármaco aspirina (200 mg/kg), con 10 ratas por cada grupo. A los grupos de ensayo se administró por vía sublingual, inyección intravenosa. Antes del ensayo, se usó el procedimiento de medición con magnificación capilar, para medir el volumen normal del pie derecho posterior de las ratas en cada grupo. Para evitar errores, se fijó la locación de medición y la operación fue hecha por una persona tanto antes como después de la administración. El promedio del valor de las dos mediciones fue tomado como el volumen normal del pie derecho posterior de las ratas, antes de la administración. Después de la administración, se inyectó inmediatamente por vía subcutánea 0,1 ml de carragenina al 1% en la pata del pie derecho posterior de la rata, para inducir inflamación. Se midió el volumen de la pata derecha a 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 min después de haber inducido la inflamación. Se comparó la diferencia entre los grupos mediante procesamiento de ensayo t entre los grupos, a través del porcentaje de diferencia (relación de hinchamiento) del volumen de pata antes y después de haber inducido inflamación en la rata.

$$\text{Relación de hinchamiento (\%)} = \frac{\text{Volumen de pata del pie derecho posterior después de inducir la inflamación} - \text{Volumen de pata del pie derecho posterior antes de administración}}{\text{Volumen de pata del pie derecho posterior antes de administración}} \times 100 \%$$

25 Resultado

Comparado con el grupo de control de blanco, el grupo de dosificación elevada de éster de ibuprofeno de filigenina

5 tuvo efectos inhibidores significativos ($p < 0,05$ - $p < 0,001$) sobre el hinchamiento de pata de rata inducido por carragenina dentro de 30 min a 360 min después de la administración, el cual fue obviamente mejor que el del profármaco filigenina ($p < 0,05$ - $p < 0,001$), y el efecto terapéutico a 30 min después de la administración fue obviamente mejor que el del profármaco ibuprofeno ($p < 0,05$); el grupo de dosificación media de éster de
10 ibuprofeno de filigenina tuvo efectos inhibidores significativos ($p < 0,05$ - $p < 0,01$) para el hinchamiento de pata de rata inducido por r dentro de 30 min a 240 min después de la administración, su efecto terapéutico a 30 min-120 min después de la administración fue obviamente mejor que el del profármaco filigenina, y el efecto terapéutico a 240 min después de la administración fue obviamente mejor que el del profármaco ibuprofeno. Los resultados del presente ensayo demostraron que el éster de ibuprofeno de filigenina tuvo comparativamente obvio efecto antiinflamatorio, y su efecto terapéutico es mejor que el de los profármacos de filigenina e ibuprofeno. Véase la tabla 2-10.

Tabla 2-7 Impacto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre la fiebre de rata causada por levadura de cerveza (x±s,n=10)

Grupos	Normal	Después de inducir la fiebre 6,0h	Temperatura corporal (°C)			
			Tiempo después de administración (h)			
			1	2	3	4
Grupo de control del modelo (%)	37,72±0,90	39,30±0,54 4,22±2,11###	39,44±0,58 0,37±1,66	39,42±0,47 0,31±1,77	38,88±0,46 -1,07±1,54	38,57±0,49 -1,86±1,20
Paracetamol (100 mg/kg) (%)	37,55±0,70	39,48±0,62 5,14±1,42###	38,66±0,58 -2,07±0,54**	38,19±0,59 -3,27±0,77***	37,98±0,19 -3,80±1,43***	37,84±0,32 -4,15±1,59***
Ibuprofeno (300mg/kg) (%)	37,66±0,70	39,63±0,32 5,22±1,42###	39,21±0,11 -1,05±0,54*	38,92±0,35 -1,79±0,77*	38,71±0,20 -2,32±1,41**	38,49±0,51 -2,88±1,50**
Filigenina(10,0mg/kg) (%)	37,52±0,56	39,44±0,69 5,13±1,45###	39,40±0,43 -0,09±1,11	39,20±0,52 -0,61±1,67	38,81±0,37 -1,59±1,70*	38,67±0,58 -1,95±1,14*
Ester de ibuprofeno de filigenina						
2,5mg/kg (%)	37,33±0,56	39,33±0,69 5,36±1,40###	38,93±0,43 -1,01±1,05*Δ	38,75±0,43 -1,48±1,11*Δ	38,56±0,52 -1,97±1,67*	38,25±0,58 -2,47±1,80**
5,0mg/kg (%)	37,39±0,53	39,23±0,43 4,92±1,28###	38,48±0,59 -1,91±0,40*Δ	38,33±0,50 -2,29±0,54**ΔΔ	37,85±0,33 -3,52±0,38***ΔΔ	37,67±0,45 3,98±0,52***ΔΔ
10,0mg/kg (%)	37,53±0,55	39,44±0,63 5,10±1,57###	38,61±0,51 2,10±0,53**ΔΔ	39,13±0,45 -3,33±0,98*** ΔΔΔΔ	37,8±0,40 4,01±1,12***ΔΔΔ	37,74±0,31 4,30±1,26***ΔΔΔ

Comparado con el normal (antes de inducir la fiebre) ###P<0,001
 Comparado con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001
 Comparado con el éster de ibuprofeno de filigenina y grupo de ibuprofeno, ΔP<0,05, ΔΔP<0,01
 Comparado con el éster de ibuprofeno de filigenina y grupo de filigenina, ΔP<0,05, ΔΔP<0,01, ΔΔΔP<0,001

Tabla 2-8 efecto de éster de ibuprofeno de filigenina sobre la temperatura corporal de conejo, causada por las vacunas tifóide y y paratífóide (x±s,n=6)

Grupos	Normal	Después de inducir fiebre 1,0h	Temperatura corporal (°C)					
			30	60	90	120	180	240
Grupo blanco de control	39,47±0,21	39,50±0,24	39,56±0,23	39,45±0,24	39,54±0,25	39,49±0,27	39,56±0,23	39,59±0,25
(%)	0,15±0,20	0,15±0,20	0,11±0,15	-0,13±0,16	0,11±0,15	-0,02±0,19	0,15±0,23	0,23±0,05
Grupo de control de modelo	39,68±0,53	41,10±0,53	41,23±0,53	41,27±0,51	41,22±0,51	41,21±0,54	40,95±0,47	40,49±0,59
(%)	3,60±1,08 ^{###}	0,32±0,25	0,41±0,18 ^{##}	0,28±0,10 [#]	0,26±0,21 [#]	-0,36±0,21 [#]	-1,48±0,24 ^{###}	
Paracetamol (50 mg/kg)	39,53±0,40	40,09±0,45	40,53±0,68	40,10±0,48	39,83±0,57	39,72±0,54	39,61±0,48	39,53±0,46
(%)	3,71±0,28 ^{###}	-1,14±0,59 [*]	-2,18±0,16 ^{**}	-2,83±0,16 ^{***}	-3,11±0,29 ^{***}	-3,38±0,25 ^{***}	-3,58±0,36 ^{***}	
Ibuprofeno (300mg/kg)	39,62±0,37	41,11±0,38	40,74±0,52	40,56±0,40	40,07±0,44	39,88±0,55	39,77±0,53	39,63±0,41
(%)	3,75±0,21 ^{###}	-0,90±0,41 [*]	-1,35±0,11 [*]	-2,52±0,13 ^{**}	-3,00±0,23 ^{***}	-3,25±0,29 ^{***}	-3,60±0,32 ^{***}	
Filigenina (10,0mg/kg)	39,50±0,21	41,04±0,49	41,15±0,47	40,83±0,45	40,67±0,30	40,47±0,49	40,29±0,31	40,19±0,33
Éster de ibuprofeno de filigenina								
1,25mg/kg	39,50±0,29	41,08±0,42	40,68±0,41	40,61±0,38	40,50±0,39	40,29±0,42	40,10±0,35	39,89±0,39
(%)	3,99±0,55 ^{###}	0,98±0,11	-1,15±0,15 ^{**}	-1,40±0,20 [*]	-1,92±0,31 ^{***}	-2,39±0,43 ^{***}	-2,89±0,23 ^{***}	
2,5mg/kg	39,78±0,26	41,28±0,32	40,83±0,39	40,37±0,33	40,12±0,21	40,02±0,20	39,90±0,25	39,79±0,29
(%)	3,79±0,45 ^{###}	-1,10±0,00 ^{**}	-2,20±0,06 ^{**}	-2,81±0,12 ^{***}	-3,06±0,43 ^{***}	-3,35±0,29 ^{***}	-3,60±0,36 ^{***}	
5,0mg/kg	39,72±0,36	41,11±0,26	40,57±0,28	40,04±0,20	39,88±0,23	39,65±0,20	39,42±0,25	39,17±0,28
(%)	3,51±0,43 ^{###}	-1,30±0,11 ^{**}	-2,61±0,10 ^{**}	-2,98±0,22 ^{***}	-3,54±0,18 ^{***}	-4,10±0,17 ^{***}	-4,37±0,15 ^{***}	

Comparado con el grupo de control del blanco, [#]p<0,05, ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001
 Comparado con el grupo de control del modelo, ^{*}p<0,05, ^{**}p<0,01, ^{***}p<0,001
 Comparación entre el grupo de éster de ibuprofeno de filigenina y el grupo de ibuprofeno, ^Δp<0,05, ^{ΔΔ}p<0,01
 Comparación entre el grupo de éster de ibuprofeno de filigenina y el grupo de filigenina, [▲]p<0,05, ^{▲▲}p<0,01, ^{▲▲▲}p<0,001

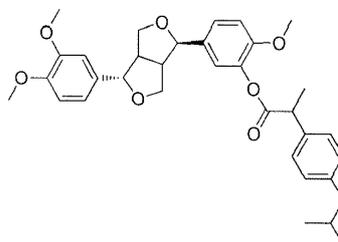
Tabla 2-10 Efecto inhibidor de éster de ibuprofeno de filigenina sobre hinchamiento de pata de rata, inducido por carragenina (x±s, n=10)

Grupos	Relación de hinchamiento (%)							
	30min	60min	120min	180min	240min	300min	360min	
Grupo de control blanco	0,295±0,101	0,350±0,165	0,525±0,357	0,860±0,331	0,885±0,341	1,010±0,410	1,065±0,341	
Aspirina (200 mg/kg)	0,120±0,138**	0,168±0,172*	0,215±0,178*	0,343±0,337**	0,470±0,289**	0,690±0,369	0,525±0,338**	
Ibuprofeno (300mg/kg)	0,110±0,119**	0,151±0,172*	0,210±0,178*	0,330±0,337**	0,460±0,289**	0,681±0,369	0,623±0,338**	
Filigenina (10,0mg/kg)	0,245±0,210	0,283±0,176	0,360±0,156	0,560±0,216*	0,725±0,294	0,890±0,226	0,875±0,231	
Éster de ibuprofeno de filigenina								
2,5mg/kg	0,215±0,120	0,293±1,117	0,450±0,254	0,800±0,339	0,865±0,303	1,045±0,308	0,930±0,200	
5,0mg/kg	0,065±0,112***▲▲	0,127±0,178**▲▲	0,209±0,438*▲	0,338±0,524**	0,461±0,402**▲	0,688±0,503	0,675±0,578	
10,0mg/kg	0,025±0,210***▲▲▲	0,079±0,156**▲▲▲	0,140±0,156***▲▲▲	0,191±0,216***▲▲	0,255±0,294***▲▲	0,310±0,226***▲▲	0,405±0,231***	

Comparado con el grupo de control de blanco *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001
 Comparación entre el grupo de éster de ibuprofeno de filigenina y el grupo de ibuprofeno, ΔP<0,05, ΔΔP<0,01, ΔΔΔP<0,001
 Comparación entre el grupo de éster de ibuprofeno de filigenina y el grupo de filigenina, ▲P<0,05, ▲▲P<0,01, ▲▲▲P<0,001

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de éster de ibuprofeno de filigenina con fórmula estructural general representada por la fórmula (I):



- 5 (I)
2. Un procedimiento de preparación del compuesto de éster de ibuprofeno de filigenina de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas ejecutadas de manera secuencial:
- A) el ibuprofeno es sometido a una reacción de acilación con un agente de acilación para obtener cloruro de acil ibuprofeno; y
- 10 B) se lleva a cabo una reacción de esterificación entre filigenina y cloruro de acil ibuprofeno con la acción de un catalizador para obtener el producto final.
3. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** el agente de acilación en la etapa A) es seleccionado de cloruro de tionilo, tricloruro de fósforo, pentacloruro de fósforo, oxiclорuro de fósforo u oxipentacloruro de fósforo.
- 15 4. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, **caracterizado porque** el catalizador en la etapa B) es seleccionado de una base orgánica o una base inorgánica.
5. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** la base inorgánica es seleccionada de carbonato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de sodio o bicarbonato de potasio y la base orgánica es seleccionada de piridina, trietilamina, N,N-dimetilformamida o un alcóxido de metal.
- 20 6. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, **caracterizado porque** la relación molar de filigenina en la etapa B) a ibuprofeno en la etapa A) es 0,8-1,2:1.
7. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, **caracterizado porque** la reacción de esterificación en la etapa B) es llevada a cabo con agitación después de añadir la filigenina y el cloruro de acil ibuprofeno a un solvente orgánico.
- 25 8. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 que comprende además la etapa C en la cual después de la reacción de esterificación el producto es sometido al aislamiento y tratamiento de purificación, se retira el solvente de reacción del producto después de la reacción de esterificación y a continuación el sólido es sometido al tratamiento de recristalización.
9. Éster de ibuprofeno de filigenina de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso como un agente antiviral.
- 30 10. Una aplicación del éster de ibuprofeno de filigenina de acuerdo con la reivindicación 1, en la preparación de una medicina o producto para el cuidado de la salud, para tratar enfermedades virales.
11. La aplicación de acuerdo con la reivindicación 10, en la que las enfermedades virales son aquellas causadas por virus de influenza, virus de parainfluenza, virus sincitiales respiratorios (RSV), virus de herpes zoster simplex tipo I (HSV-I) y virus coxsackie A16.
- 35 12. Una medicina antiviral que contiene un éster de ibuprofeno de filigenina de acuerdo con la reivindicación 1.