

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 611**

51 Int. Cl.:

C07D 493/04 (2006.01)
A61K 31/34 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2014 PCT/CN2014/090465**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15070724**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2014 E 14861789 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3072895**

54 Título: **Sulfato de filigenol y derivados del mismo, y procedimiento de preparación y su aplicación**

30 Prioridad:

18.11.2013 CN 201310580801

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FAN, HONGYU y
WANG, SHUO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 749 611 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

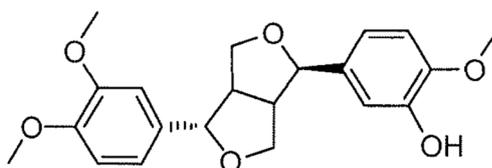
Sulfato de filigenol y derivados del mismo, y procedimiento de preparación y su aplicación

5 La presente invención pertenece al campo de la química medicinal y, en particular, se refiere a un sulfato de filigenina y a un procedimiento de preparación del mismo, así como a los efectos farmacológicos de dichos derivados en términos de resistencia viral.

10 La filigenina, como parte aglicona de la forsitina, es un componente activo principal de *Forsythia suspensa* del género *Forsythia* en la familia *Oleaceae* y tiene una estructura como se representa a continuación. Las investigaciones farmacológicas modernas muestran que la filigenina tiene un efecto antiviral, antioxidante y reductor de los lípidos en la sangre que elimina los radicales libres, antibacterianos, antitumorales y antiinflamatorios.

15

20



25 La filigenina tiene moléculas inestables que son propensas a oxidarse y fáciles de cambiar la configuración en un ambiente ácido. Las investigaciones que simulan el metabolismo de la forsitina a través de bacterias entéricas de rata han descubierto que la la forsitina es fácilmente metabolizada por flora intestinal en un nuevo metabolito.

30

Las investigaciones sobre el metabolismo de los fármacos estructurales fenólicos han descubierto que los fármacos con la estructura del hidróxido fenólico se metabolizan fácilmente mediante sulfatas *in vivo* en derivados de sulfato de fenol y tienen buena actividad. Por ejemplo, derivados de sulfato de daidzeína, derivados de sulfato de edaravona, derivados de sulfato de genisteína, derivados de sulfato de resveratrol. Por lo tanto, los presentes inventores han diseñado derivados de sulfato de filigenina y llevado a cabo síntesis química y estudios farmacológicos.

35 Cada uno de los artículos científicos de Yun-Xia et al, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, vol 34, n.º 2, junio de 2009, 79-83 y de Xia Wang et al, *Integrative Biology*, vol 5, n.º 2, 31 de octubre de 2012, 351-371 divulga derivados de filigenina y su uso en terapia.

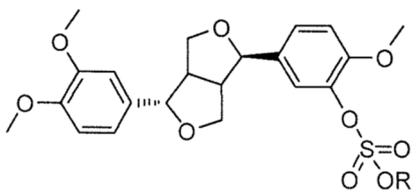
40

El problema técnico a resolver por la presente invención es preparar un sulfato de filigenina por procedimiento químico sintético. La presente invención proporciona un sulfato de filigenina. Además, la presente invención también proporciona un procedimiento para preparar un sulfato de filigenina, y es adecuado para la producción a escala industrial.

45

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un sulfato de filigenina como se representa por la siguiente fórmula estructural química:

50



55

en la que R es H, Na⁺, K⁺, NH₄⁺, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metil amino, dimetilamino, trimetilamino, trietilamino, dietilamino, etilamino, etanolamino, dietanolamino, piperidilo, piperazinilo o pirazinilo.

60

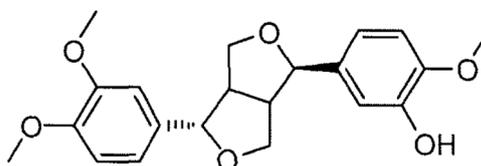
En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el sulfato de filigenina de la presente invención y excipientes farmacéuticamente aceptables.

65 En la presente memoria, los excipientes farmacéuticamente aceptables se refieren a agentes de carga, diluyentes, portadores, reguladores de pH, reguladores de la potencia iónica, agentes de liberación lenta o de liberación controlada, materiales de envoltura u otros excipientes farmacéuticos sólidos, no sólidos o líquidos no tóxicos. El vehículo usado se puede adaptar al modo de administración del fármaco correspondiente, puede usar los excipientes que los expertos en la técnica conocen para formular en inyecciones, polvo liofilizado (para inyección), aerosoles, soluciones orales, suspensiones orales, tabletas, cápsulas, tabletas entéricas, píldoras, polvos, gránulos, preparaciones de liberación sostenida o de liberación retardada. Los sulfatos de filigenina del primer

aspecto de la presente invención se prefieren y administran por inyección o a través del tracto digestivo, por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención es preferentemente inyecciones o preparaciones administradas a través del tracto digestivo, es decir, los materiales auxiliares adecuados para formularse en inyecciones o preparaciones administradas a través del tracto digestivo son particularmente preferentes, en el que en la presente memoria, la "administración a través del tracto digestivo" se refiere a un enfoque de administración de preparaciones de fármacos a través del tracto digestivo de los pacientes, que comprende administración oral, administración intragástrica, administración de enema, preferentemente administración oral; por ejemplo, los excipientes que son bien conocidos por los expertos en la técnica se pueden usar para formular soluciones orales, suspensiones orales, tabletas, cápsulas, tabletas entéricas, píldoras, polvos, gránulos, preparaciones de liberación sostenida o de liberación retardada; en las que las preparaciones inyectables son principalmente inyecciones e inyecciones en polvo.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación del sulfato de filigenina del primer aspecto de la invención que comprende las siguientes etapas realizadas secuencialmente:

1) disolver un filigenol en un solvente orgánico para obtener una solución de filigenol, en el que el filigenol está representado por la siguiente fórmula estructural química:



2) primero agregar un agente sulfatante en la solución de filigenol y mezclar bien; y luego, llevar a cabo una reacción de esterificación para obtener una mezcla de producto líquido;
3) agregar una base para ajustar el valor de pH de la mezcla líquida a 8-10; y
4) separar y purificar la mezcla líquida para obtener el producto final.

Preferentemente, el solvente orgánico en la etapa 1) se selecciona entre uno de piridina, N,N-dimetilmetilformamida, N,N-dimetilacetamida o diclorometano.

Preferentemente, el agente sulfatante se agrega a la solución de filigenol a 0-5 °C.

En particular, el agente sulfatante se agrega a la solución de filigenol a 0 °C y se agita uniformemente.

En particular, el agente sulfatante se selecciona de un ácido clorosulfónico, un complejo de trióxido de azufre-trietilamina, un complejo de trióxido de azufre-piridina o un complejo de trióxido de azufre-trimetilamina, y preferentemente el ácido clorosulfónico.

En particular, la relación molar del filigenol en la solución de filigenol al agente sulfatante es 1:1-10, y preferentemente 1:2.

Preferentemente, la temperatura de la reacción de esterificación en la etapa 2) es 0-110 °C.

En particular, la temperatura de reacción de la reacción de esterificación realizada en el filigenol y el ácido clorosulfónico es 0-10 °C, y preferentemente 10 °C; la temperatura de reacción de la reacción de esterificación realizada en el filigenol y el complejo de trióxido de azufre-trietilamina, el complejo de trióxido de azufre-piridina o el complejo de trióxido de azufre-trimetilamina es de 100-110 °C.

En particular, después de la reacción de esterificación realizada en el filigenol y el complejo de trióxido de azufre-trietilamina, el complejo de trióxido de azufre-piridina o el complejo de trióxido de azufre-trimetilamina, el procedimiento incluye además enfriar la mezcla de la reacción de esterificación, y luego agregar una base para ajustar el valor de pH de la mezcla a 8-10.

En particular, la mezcla de la reacción de esterificación se enfría a temperatura ambiente (10-30 °C).

Preferentemente, el valor de pH en la etapa 3) es preferentemente 10; la base se selecciona de una base orgánica o una base inorgánica.

En particular, la base inorgánica se selecciona entre uno de carbonato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco acuoso, y preferentemente hidróxido de sodio, solución de hidróxido de potasio o amoníaco acuoso; la base orgánica se selecciona entre tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina, etanol

amina, dietanolamina, piperidina, piperazina o pirazina.

Preferentemente, el líquido de la mezcla del producto se separa usando cromatografía en columna en gel de sílice en la etapa 4).

5

En particular, el gel de sílice es gel de sílice GF254.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un medicamento antiviral caracterizado por contener un sulfato de filigenina como se describe en la presente memoria.

10

Preferentemente, los medicamentos antivirales se seleccionan entre medicamentos contra la influenza, medicamentos contra la parainfluenza, medicamentos contra el virus sincitial respiratorio, medicamentos contra el virus del herpes simple de tipo I y medicamentos contra el virus Coxsackie A16.

15

Las ventajas de la presente invención son las siguientes: el procedimiento de preparación del sulfato de filigenina de la presente invención es fácil de controlar, tiene un alto rendimiento del producto y es adecuado para la producción industrial en masa; el sulfato de filigenina de la presente invención tiene un efecto antiviral significativo, y la eficacia de inhibición del virus alcanza más del 80%. Los resultados de las pruebas antivirales *in vivo* muestran que el sulfato de filigenina tiene efectos de inhibición relativamente significativos sobre el virus de la influenza y el virus de la parainfluenza, así como la neumonía viral de los ratones causada, por lo que puede reducir significativamente el índice pulmonar y el título de hemaglutinación, y también hacer mejoras significativas en histopatología pulmonar.

20

La Figura 1 es una imagen de examen microscópico de la sección patológica del tejido pulmonar de ratones en un modelo de neumonía por virus de la influenza; y

25

La Figura 2 es una imagen de examen microscópico de la sección patológica del tejido pulmonar de ratones en un modelo de neumonía por virus de la influenza.

30

La presente invención se describe adicionalmente a través de las siguientes realizaciones. Sin embargo, estas realizaciones solo tienen fines ilustrativos y no deben interpretarse como una limitación del alcance de la presente invención. Además, los reactivos y las materias primas en las realizaciones pueden estar disponibles en el mercado, si no se menciona, se puede hacer referencia a la guía de síntesis orgánica, a la guía de administración regulatoria de medicamentos y a las instrucciones correspondientes de los fabricantes sobre equipos y reactivos, etc.

35

Realización 1

40

1. Se agrega filigenol (4 g, 10,75 mmol) en 180 ml de piridina anhidra seca, y se agita para disolver, para obtener una solución de filigenol;

2. Bajo la condición de un baño de hielo, se agrega gota a gota una solución de diclorometano de ácido clorosulfónico (1,4 ml, aproximadamente 21,5 mmol) a la solución de filigenol, se agita al mismo tiempo y la velocidad de la adición gota a gota es de 1 gota (aproximadamente 50 ul/gota)/2 s, es decir, la relación molar del filigenol al ácido clorosulfónico en la presente realización es 1:2.

45

3. Después de completar la adición gota a gota, bajo condiciones de agitación, la temperatura se eleva y se mantiene a 10 °C, y se lleva a cabo la reacción de esterificación;

4. Bajo la condición de mantener la temperatura a 10 °C, se completa la reacción de esterificación, tras la reacción durante 1 h, se agrega una solución de metanol (5 ml) de hidróxido de sodio para ajustar el valor de pH a 10, la mezcla de reacción se destila posteriormente con una presión reducida para eliminar el solvente; luego, la muestra se carga en cromatografía en columna en gel de sílice GF254, el eluyente es una mezcla líquida de cloroformo y metanol, en la que la relación volumétrica del cloroformo al metanol es de 9:1. Se obtiene un sulfato sódico de filigenina (compuesto 1) mediante cromatografía en columna en gel de sílice.

50

El sulfato sódico de filigenina (3 g) es un sólido blanco, que es soluble en agua y etanol. Después de extenderse en una placa TLC (con la solución cromatográfica siendo cloroformo/metanol 10:1 y R_f siendo 0,4), muestra un color rojo púrpura al rociar 10% de reactivo de H₂SO₄-etanol. En un espectro ESI-MS, m/z[M-Na]⁻ es 451, el peso molecular es 474.

55

La ¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO) del compuesto 1 es la siguiente:

60

δ (ppm): 7,4 (1H, d, J = 8,4Hz, H-), 6,9 (5H, m, Ar-H), 4,8 (1H, d, J = 4,8Hz, H-6), 4,38 (H, d, J = 6,6Hz, H-8), 4,10 (1H, d, J = 9,0Hz, H-2), 3,75 (12H, d, J = 8,4Hz, H-8,4, O-CH₃), 3,11 (1H, t, J = 8,1Hz, H-5), 2,85 (1H, d, J = 7,2Hz, H-1);

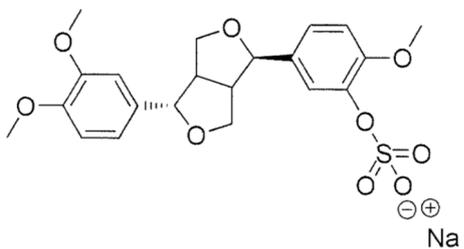
La ¹³C-NMR (150 MHz, d₆-DMSO) del compuesto 1 es la siguiente:

65

δ (ppm): 150,99 (C-3"), 148,97 (C-3'), 148,10 (C-4"), 142,51 (C-4'), 137,20 (C-1"), 131,73 (C-1'), 121,33 (C-5'),

118,09 (C-6'), 118,06 (C-6''), 112,09 (C-5''), 110,94 (C-2'), 110,00 (C-2''), 87,22 (C-2), 81,76 (C-6), 70,87 (C-8), 69,44 (C-4), 56,23 (C-OCH₃), 55,99 (C-OCH₃), 54,54 (C-OCH₃), 53,37 (C-1), 49,78 (C-5) ppm

De acuerdo con los datos de prueba de ESI-MS, ¹H-NMR y ¹³C-NMR, se determina que la fórmula molecular del compuesto 1 es: C₂₁H₂₃O₉SNa, y la fórmula estructural es:



Realización 2

- Se agrega filigenol (4 g, 10,75 mmol) en 180 ml de piridina anhidra seca, y se agita para disolver, para obtener una solución de filigenol;
- Bajo la condición de un baño de hielo, se agrega gota a gota una solución de diclorometano de ácido clorosulfónico (1,4 ml, aproximadamente 21,5 mmol) a la solución de filigenol. La agitación se realiza al mismo tiempo, y la velocidad de la adición gota a gota es de 1 gota (aproximadamente 50 ul/gota)/2 s, es decir, la relación molar del filigenol al ácido clorosulfónico en la presente realización es 1:2.
- Después de completar la adición gota a gota, bajo condiciones de agitación, la temperatura se eleva y se mantiene a 10 °C, y se lleva a cabo la reacción de esterificación;
- Bajo la condición de mantener la temperatura a 10 °C, se completa la reacción de esterificación, tras una reacción de 1 h, se agrega una solución de metanol (5 ml) de hidróxido de potasio para ajustar el valor de pH a 10, la mezcla de reacción se destila posteriormente con una presión reducida para eliminar el solvente; luego, la muestra se carga en cromatografía en columna en gel de sílice GF254, el eluyente es una mezcla líquida de cloroformo y metanol, en la que la relación volumétrica del cloroformo al metanol es de 9:1. Se obtiene un sulfato de potasio filigenina (compuesto 2) mediante cromatografía en columna en gel de sílice.

El sulfato de potasio filigenina (3 g) es un sólido blanco, que es soluble en agua y etanol. Después de extenderse en una placa TLC (con la solución cromatográfica siendo cloroformo/metanol 10:1 y R_f siendo 0,4), muestra un color rojo púrpura al rociar 10% de reactivo de H₂SO₄-etanol. En el espectro ESI-MS, m/z[M-K]⁻ es 451, y el peso molecular es 490.

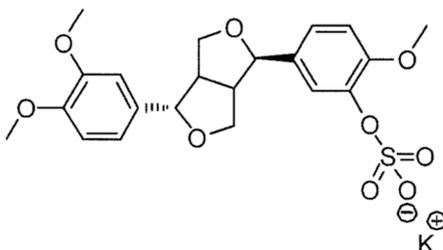
La ¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO) del compuesto 2 es la siguiente:

δ (ppm): 7,4 (1H, d, J = 8,4Hz, H-), 6,9 (5H, m, Ar-H), 4,8 (1H, d, J = 4,8Hz, H-6), 4,38 (H, d, J = 6,6Hz, H-8), 4,10 (1H, d, J = 9,0Hz, H-2), 3,75 (12H, d, J = 8,4Hz, H-8,4, O-CH₃), 3,10 (1H, t, J = 8,1Hz, H-5), 2,84 (1H, d, J = 7,2Hz, H-1);

La ¹³C-NMR (125 MHz, d₆-DMSO) del compuesto 2 es la siguiente:

δ (ppm): 150,99 (C-3''), 148,97 (C-3'), 148,10 (C-4''), 142,51 (C-4'), 137,20 (C-1''), 131,73 (C-1'), 121,33 (C-5'), 118,09 (C-6'), 118,06 (C-6''), 112,09 (C-5''), 110,95 (C-2'), 110,00 (C-2''), 87,23 (C-2), 81,76 (C-6), 70,87 (C-8), 69,44 (C-4), 56,21 (C-OCH₃), 55,99 (C-OCH₃), 54,52 (C-OCH₃), 53,37 (C-1), 49,78 (C-5) ppm.

De acuerdo con los datos de prueba de ESI-MS, ¹H-NMR y ¹³C-NMR, se determina que la fórmula molecular del compuesto 2 es: C₂₁H₂₃O₉SK; y la fórmula estructural es:



Realización 3

- Se agrega filigenol (4 g, 10,75 mmol) en 180 ml de piridina anhidra seca, y se agita para disolver, para obtener una solución de filigenol;

2. Bajo la condición de un baño de hielo, se agrega gota a gota una solución de diclorometano de ácido clorosulfónico (1,4 ml, aproximadamente 21,5 mmol) a la solución de filigenol. La agitación se realiza al mismo tiempo, y la velocidad de la adición gota a gota es de 1 gota (aproximadamente 50 ul/gota)/2 s, es decir, la relación molar del filigenol al ácido clorosulfónico en la presente realización es 1:2.

3. Después de completar la adición gota a gota, bajo condiciones de agitación, la temperatura se eleva y se mantiene a 10 °C, y se lleva a cabo la reacción de esterificación;

4. Bajo la condición de mantener la temperatura a 10 °C, se completa la reacción de esterificación, tras una reacción de 1 h, se agrega agua amoniacal (5 ml) para ajustar el valor de pH a 8, la mezcla de reacción se destila posteriormente a presión reducida para eliminar el solvente; luego, la muestra se carga en cromatografía en columna en gel de sílice GF254, el eluyente es una mezcla líquida de cloroformo y metanol, en la que la relación volumétrica del cloroformo al metanol es de 9:1. Se obtiene un sulfato de amonio de filigenina (compuesto 3) mediante cromatografía en columna en gel de sílice.

El sulfato de amonio de filigenina (3 g) es un sólido blanco, que es soluble en agua y etanol. Después de extenderse en una placa TLC (con la solución cromatográfica siendo cloroformo/metanol 10:1 y Rf siendo 0,4), muestra un color rojo púrpura al rociar 10% de reactivo de H₂SO₄-etanol. En el espectro ESI-MS, m/z[M-NH₄]⁺ es 451, y el peso molecular es 469.

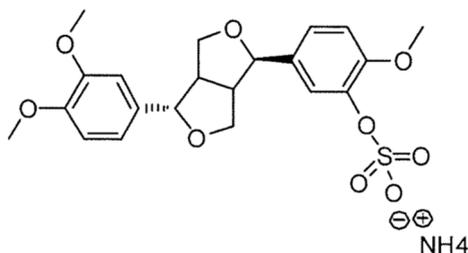
La ¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO) del compuesto 3 es la siguiente:

δ (ppm): 7,4 (1H, d, J = 8,4Hz, H-), 6,9 (5H, m, Ar-H), 4,8 (1H, d, J = 4,8Hz, H-6), 4,38 (H, d, J = 6,6Hz, H-8), 4,10 (1H, d, J = 9,0Hz, H-2), 3,75 (12H, d, J = 8,4Hz, H-8,4, O-CH₃), 3,12 (1H, t, J = 8,1Hz, H-5), 2,86 (1H, d, J = 7,2Hz, H-1);

La ¹³C-NMR (125 MHz, d₆-DMSO) del compuesto 3 es la siguiente:

δ (ppm): 150,99 (C-3"), 148,97 (C-3'), 148,10 (C-4"), 142,51 (C-4'), 137,20 (C-1"), 131,73 (C-1'), 121,32 (C-5'), 118,09 (C-6'), 118,06 (C-6"), 112,09 (C-5"), 110,94 (C-2'), 110,00 (C-2"), 87,22 (C-2), 81,76 (C-6), 70,87 (C-8), 69,44 (C-4), 56,21 (C-OCH₃), 55,99 (C-OCH₃), 54,52 (C-OCH₃), 53,37 (C-1), 49,78 (C-5) ppm.

De acuerdo con los datos de prueba de ESI-MS, ¹H-NMR y ¹³C-NMR, se determina que la fórmula molecular del compuesto 3 es: C₂₁H₂₇NO₉S; y la fórmula estructural es:



Realización 4

1. Se agrega filigenol (4 g, 10,75 mmol) a 180 ml de N,N-dimetilformamida anhidra seca, y se agita para disolver, para obtener una solución de filigenol;

2. Bajo la condición de un baño de hielo, se agrega gota a gota una solución de diclorometano que contiene un compuesto de trióxido de azufre-trietilamina (3,89 g, aproximadamente 21,5 mmol) en la solución de filigenol; la agitación se realiza al mismo tiempo, y la velocidad de la adición gota a gota es de 1 gota (aproximadamente 50 ul/gota)/2 s, es decir, la relación molar del filigenol al compuesto de trióxido de azufre-trietilamina en la presente realización es de 1:2.

3. Después de completar la adición gota a gota, bajo condiciones de agitación, la temperatura se eleva y se mantiene a 110 °C, y se lleva a cabo la reacción de esterificación;

4. Bajo la condición de mantener la temperatura a 110 °C, se completa la reacción de esterificación, tras una reacción de 1 h, la temperatura se reduce a temperatura ambiente, se agrega agua amoniacal (5 ml) para ajustar el valor de pH a 8, la mezcla de reacción se destila posteriormente con una presión reducida para eliminar el solvente, luego, la muestra se carga en cromatografía en columna en gel de sílice GF254, el eluyente es una mezcla líquida de cloroformo y metanol, en la que la relación volumétrica del cloroformo al metanol es de 9:1. Se obtiene un sulfato de amonio de filigenina (compuesto 3) mediante cromatografía en columna en gel de sílice.

El sulfato de amonio de filigenina (3 g) es un sólido blanco, que es soluble en agua y etanol. Después de extenderse sobre una placa TLC (con la solución cromatográfica siendo cloroformo/metanol 10:1 y Rf siendo 0,4), muestra un color rojo púrpura al rociar 10% de reactivo de H₂SO₄-etanol. En el espectro ESI-MS, m/z [M-NH₄]⁺ es 451, y el peso molecular es 469.

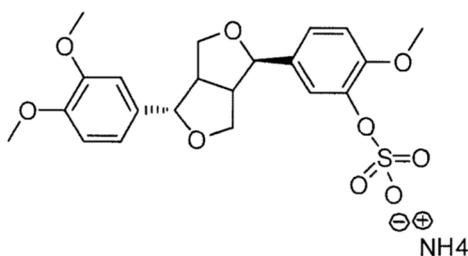
La $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, d_6 -DMSO) del compuesto 3 es la siguiente:

δ (ppm): 7,4 (1H, d, $J = 8,4\text{Hz}$, H-), 6,9 (5H, m, Ar-H), 4,8 (1H, d, $J = 4,8\text{Hz}$, H-6), 4,38 (H, d, $J = 6,6\text{Hz}$, H-8), 4,10 (1H, d, $J = 9,0\text{Hz}$, H-2), 3,75 (12H, d, $J = 8,4\text{Hz}$, H-8,4, O-CH₃), 3,12 (1H, t, $J = 8,1\text{Hz}$, H-5), 2,86 (1H, d, $J = 7,2\text{Hz}$, H-1);

La $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, d_6 -DMSO) del compuesto 3 es la siguiente:

δ (ppm): 150,99 (C-3"), 148,97 (C-3'), 148,10 (C-4"), 142,51 (C-4'), 137,20 (C-1"), 131,73 (C-1'), 121,32 (C-5'), 118,09 (C-6'), 118,06 (C-6"), 112,09 (C-5"), 110,94 (C-2'), 110,00 (C-2"), 87,22 (C-2), 81,76 (C-6), 70,87 (C-8), 69,44 (C-4), 56,21 (C-OCH₃), 55,99 (C-OCH₃), 54,52 (C-OCH₃), 53,37 (C-1), 49,78 (C-5) ppm.

De acuerdo con los datos de prueba de ESI-MS, $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$, se determina que la fórmula molecular del compuesto 3 es: $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_9\text{S}$; y la fórmula estructural es:



Realización 5

- Se agrega filigenol (4 g, 10,75 mmol) a 180 ml de N,N-dimetilformamida anhidra seca, y se agita para disolver, para obtener una solución de filigenol;
- Bajo la condición de un baño de hielo, se agrega gota a gota una solución de diclorometano que contiene un compuesto de trióxido de azufre-piridina (3,68 g, aproximadamente 21,5 mmol) a la solución de filigenol; La agitación se realiza al mismo tiempo, y la velocidad de la adición gota a gota es de 1 gota (aproximadamente 50 ul/gota)/2 s, es decir, la relación molar del filigenol al compuesto de trióxido de azufre-piridina en la presente realización es 1:2)
- Después de completar la adición gota a gota, bajo condiciones de agitación, la temperatura se eleva y se mantiene a 110 °C, y se lleva a cabo la reacción de esterificación;
- Bajo la condición de mantener la temperatura a 110 °C, se completa la reacción de esterificación, tras una reacción de 1 h, la temperatura se reduce a temperatura ambiente, se agrega una solución de metanol de hidróxido de potasio (5 ml) para ajustar el valor de pH a 8, la mezcla de reacción se destila posteriormente con una presión reducida para eliminar el solvente, luego, la muestra se carga en cromatografía en columna en gel de sílice GF254, el eluyente es una mezcla líquida de cloroformo y metanol, en la que la relación volumétrica del cloroformo al metanol es de 9:1. Se obtiene un sulfato de potasio filigenina (compuesto 2) mediante cromatografía en columna en gel de sílice.

El sulfato de potasio de filigenina (3 g) es un sólido blanco, que es soluble en agua y etanol. Después de extenderse sobre una placa TLC (con la solución cromatográfica siendo cloroformo/metanol 10:1 y R_f siendo 0,4), muestra un color rojo púrpura al rociar 10% de reactivo de H₂SO₄-etanol. En el espectro ESI-MS, m/z [M-K]⁺ es 451, y el peso molecular es 490.

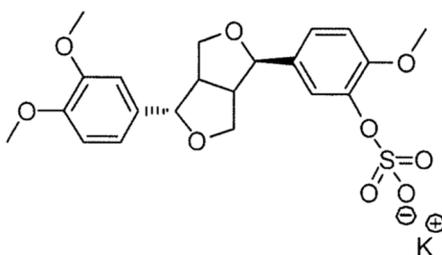
La $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, d_6 -DMSO) del compuesto 2 es la siguiente:

δ (ppm): 7,4 (1H, d, $J = 8,4\text{Hz}$, H-), 6,9 (5H, m, Ar-H), 4,8 (1H, d, $J = 4,8\text{Hz}$, H-6), 4,38 (H, d, $J = 6,6\text{Hz}$, H-8), 4,10 (1H, d, $J = 9,0\text{Hz}$, H-2), 3,75 (12H, d, $J = 8,4\text{Hz}$, H-8,4, O-CH₃), 3,10 (1H, t, $J = 8,1\text{Hz}$, H-5), 2,84 (1H, d, $J = 7,2\text{Hz}$, H-1);

La $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, d_6 -DMSO) del compuesto 2 es la siguiente:

δ (ppm): 150,99 (C-3"), 148,97 (C-3'), 148,10 (C-4"), 142,51 (C-4'), 137,20 (C-1"), 131,73 (C-1'), 121,33 (C-5'), 118,09 (C-6'), 118,06 (C-6"), 112,09 (C-5"), 110,95 (C-2'), 110,00 (C-2"), 87,23 (C-2), 81,76 (C-6), 70,87 (C-8), 69,44 (C-4), 56,21 (C-OCH₃), 55,99 (C-OCH₃), 54,52 (C-OCH₃), 53,37 (C-1), 49,78 (C-5) ppm.

De acuerdo con los datos de prueba de ESI-MS, $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$, se determina que la fórmula molecular del compuesto 2 es: $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_9\text{SK}$; La fórmula estructural es:



Realización 6

1. Se agrega filigenol (4 g, 10,75 mmol) a 180 ml de N,N-dimetilformamida anhidra seca, y se agita para disolver, para obtener una solución de filigenol;
2. Bajo la condición de un baño de hielo, se agrega gota a gota una solución de diclorometano que contiene un compuesto de trióxido de azufre-trimetilamina (2,99 g, aproximadamente 21,5 mmol) en la solución de filigenol; la agitación se realiza al mismo tiempo, y la velocidad de la adición gota a gota es de 1 gota (aproximadamente 50 ul/gota)/2 s, es decir, la relación molar del filigenol al compuesto de trióxido de azufre-trimetilamina en la presente realización es de 1:2.
3. Después de completar la adición gota a gota, en condiciones de agitación, la temperatura se eleva y se mantiene a 100 °C, y se lleva a cabo la reacción de esterificación;
4. Bajo la condición de mantener la temperatura a 100 °C, se completa la reacción de esterificación, tras una reacción de 1 h, la temperatura se reduce a temperatura ambiente, se agrega una solución de metanol de hidróxido de potasio (5 ml) para ajustar el valor de pH a 8, la mezcla de reacción se destila posteriormente con una presión reducida para eliminar el solvente, luego, la muestra se carga en cromatografía en columna en gel de sílice GF254, el eluyente es una mezcla líquida de cloroformo y metanol, en la que la relación volumétrica del cloroformo al metanol es de 9:1. Se obtiene un sulfato de potasio filigenina (compuesto 2) mediante cromatografía en columna en gel de sílice.

El sulfato de potasio de filigenina (3 g) es un sólido blanco, que es soluble en agua y etanol. Después de extenderse sobre una placa TLC (con la solución cromatográfica siendo cloroformo/metanol 10:1 y Rf siendo 0,4), muestra un color rojo púrpura al rociar 10% de reactivo de H₂SO₄-etanol. En el espectro ESI-MS, m/z[M-K]⁻ es 451, y el peso molecular es 490.

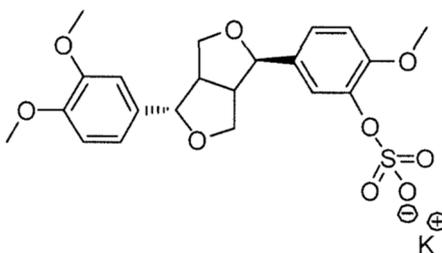
La ¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO) del compuesto 2 es la siguiente:

δ (ppm): 7,4 (1H, d, J = 8,4Hz, H-), 6,9 (5H, m, Ar-H), 4,8 (1H, d, J = 4,8Hz, H-6), 4,38 (H, d, J = 6,6Hz, H-8), 4,10 (1H, d, J = 9,0Hz, H-2), 3,75 (12H, d, J = 8,4Hz, H-8,4, O-CH₃), 3,10 (1H, t, J = 8,1Hz, H-5), 2,84 (1H, d, J = 7,2Hz, H-1);

La ¹³C-NMR (125 MHz, d₆-DMSO) del compuesto 2 es la siguiente:

δ (ppm): 150,99 (C-3''), 148,97 (C-3'), 148,10 (C-4''), 142,51 (C-4'), 137,20 (C-1''), 131,73 (C-1'), 121,33 (C-5'), 118,09 (C-6'), 118,06 (C-6''), 112,09 (C-5''), 110,95 (C-2'), 110,00 (C-2''), 87,23 (C-2), 81,76 (C-6), 70,87 (C-8), 69,44 (C-4), 56,21 (C-OCH₃), 55,99 (C-OCH₃), 54,52 (C-OCH₃), 53,37 (C-1), 49,78 (C-5) ppm.

De acuerdo con los datos de prueba de ESI-MS, ¹H-NMR y ¹³C-NMR, se determina que la fórmula molecular del compuesto 2 es: C₂₁H₂₃O₉SK. La fórmula estructural es:



Ejemplo de prueba 1 Prueba de actividades antivirales del sulfato de filigenina

1 Prueba antiviral *in vitro*

1.1 Materiales de prueba

(1) Fármacos

1) Sulfatos de filigenina: sulfato de sodio de filigenina, sulfato de potasio de filigenina y sulfato de amonio de filigenina, que son todos polvos blancos y producidos por Dalian Fusheng Natural Medicinal Development Co. Ltd., y medidos respectivamente por dos detectores de cromatografía líquida de alto rendimiento, es decir, un detector ultravioleta y detector de dispersión de luz por evaporación, a través del procedimiento de normalización de área; y las purzas de los mismos son 99,9%, 99,5% y 99,2% respectivamente.

2) Inyección de ribavirina, que es un líquido incoloro y transparente producido por Henan Runhong Pharmaceutical Co., Ltd., y el número de lote del producto es: 1206261, y el número de permiso medicinal nacional es: H19993553; su concentración es de 100 mg/ml y se toma como fármaco de control positivo en la presente prueba.

3) Fosfato de Oseltamivir, que es producido por el Instituto Nacional para el Control de Productos Farmacéuticos y Biológicos. El número de lote del producto es: 101096-200901. El fosfato de Oseltamivir se toma como fármaco de control positivo en la presente prueba, y cada inyección es de 100 mg. Todos los fármacos mencionados anteriormente se disuelven con agua purificada, se filtran, esterilizan, subenvasan y se almacenan a 4 °C para la aplicación de reserva. Todos los anteriores son fármacos que se probarán en la presente prueba.

(2) Cepa celular

La cepa celular de la célula Vero (célula de riñón de mono verde africano) se conserva en la Facultad de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad de Jilin.

(3) Cepas de virus

1) Virus de la influenza, adquirido en el Instituto de Virología de la Academia China de Medicina Preventiva.

2) Virus de la parainfluenza, adquirido en el Instituto de Virología de la Academia China de Medicina Preventiva.

3) Virus sincitial respiratorio (RSV), adquirido en el Instituto de Virología de la Academia China de Medicina Preventiva.

4) Cepa del virus Coxsackie B₃ (CVB₃), derivada de América y preservada por la oficina de enseñanza e investigación.

5) Cepa del virus Coxsackie A16 (CoxA16), proporcionada por el Hospital Nacional de Sendai de Japón como un obsequio y preservada por la oficina de enseñanza e investigación.

6) Cepa de enterovirus EV71, proporcionada por el Hospital Nacional de Sendai de Japón como un obsequio y preservada por la oficina de enseñanza e investigación.

7) Adenovirus (AdV), derivado del laboratorio pediátrico del Primer Hospital del Centro de Ciencias de la Salud Norman Bethune de la Universidad de Jilin.

8) Virus del herpes simple de tipo I (HSV-1), adquirido del Instituto Nacional para el Control de Productos Farmacéuticos y Biológicos.

(4) Equipo principal y reactivos:

Gabinete de seguridad biológica	BHC-1300IIA/B3, AIRTECH
Incubadora de CO ₂	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

1.2 Procedimiento de prueba

(1) Preparación de células

La célula Vero se subcultiva durante 1-2 días, y se convierte en rodajas, la línea límite es clara; cuando la percepción estereo y la dioptría son fuertes, tratadas con tripsina, cuando hay pocillos en forma de aguja en la superficie celular, el jugo digestivo se absorbe por completo, se toman unos pocos mililitros de caldo de cultivo para dispersar las células que luego se cuentan y diluyen con el caldo de cultivo (DMEM que contiene el 10% de suero fetal bovino) a aproximadamente $5 \times 10^7/L$, y se inoculan en una placa de cultivo de 96 pocillos hasta que las células crecen en una monocapa.

(2) Determinación de la toxicidad del fármaco.

Prueba de citotoxicidad: los fármacos se diluyen de acuerdo con las concentraciones indicadas en la Tabla 1 para

la determinación de la citotoxicidad.

Tabla 1. Tabla de referencia de dilución de fármacos

Fármaco	Gradiente de concentración							
	Gradiente 1	Gradiente 2	Gradiente 3	Gradiente 4	Gradiente 5	Gradiente 6	Gradiente 7	Gradiente 8
Sulfato sódico de forsitigenol	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125	0,039063
Sulfato potásico de forsitigenol	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125	0,039063
Sulfato amónico de forsitigenol	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125	0,039063
Rivabirina	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

Los fármacos antes mencionados que se diluyen con una solución de mantenimiento (DMEM que contiene 2% de suero fetal bovino) a diferentes concentraciones se agregan gota a gota a la célula Vero monocapa, cada pocillo es de 0,2 ml, hay 6 pocillos duplicados para cada concentración, Se proporcionan 6 pocillos para el control normal (grupo de control normal sin añadir fármacos) y 6 pocillos para el control en blanco (medio de cultivo), que se colocan en una incubadora con CO₂ al 5% a 37 °C para el cultivo, observando CPE con un microscopio invertido cada día y con registro. Después de 72 h, se añaden 20 µl (5 mg·ml⁻¹) de solución MTT en cada pocillo, y se sigue incubando durante 4 h, se succiona y desecha el caldo de cultivo en cada pocillo, se añaden 100 µl de DMSO en cada pocillo, y se agita durante 5 minutos, midiendo el valor de OD a 492 nm para calcular la tasa de supervivencia celular. En el software estadístico SPSS 18.0, la tasa de supervivencia celular se somete a un análisis de regresión Probit para calcular la concentración máxima no tóxica (TC₀) y la concentración media tóxica (TC₅₀) del fármaco en la célula Vero.

(3) Determinación de TCID₅₀ de varios virus

Se diluyen varios virus mediante una disminución de 10 veces para tener diferentes diluciones de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ y se inoculan secuencialmente en la placa de cultivo de 96 pocillos de células Vero monocapa, 100 µl para cada pocillo, 6 pocillos para cada dilución y, mientras tanto, se proporciona un grupo de control celular normal. Se incuba en 5% de CO₂ a 37 °C durante 2 h, se desecha el virus líquido, luego se agregan 100 µl de solución de mantenimiento celular a cada pocillo y se cultiva en 5% de CO₂ a 37 °C. Los resultados citopáticos se observan bajo el microscopio desde el 3er día en adelante, los resultados se determinan entre el 7° y 8° día y se registran bien, de modo que la dilución más alta se toma como el punto final donde el 50% de los pocillos celulares tienen una lesión positiva. y el título del virus se calcula utilizando un procedimiento de Karber.

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

TCID₅₀: dosis de infección de histocitos al 50%
 XM: logaritmo de la mayor concentración de dilución de virus
 d: logaritmo del coeficiente de dilución (múltiple)
 ΣP_i: la suma de cada porcentaje de lesión de dilución.

(4) Impacto del fármaco en la citopatía inducida por virus

Se adopta una placa de cultivo cubierta con células monocapa, se succiona y desecha el caldo de cultivo, se inoculan las células en una cantidad de ataques de virus que corresponden a 100TCID₅₀, y se absorben en una incubadora de CO₂ al 5% a 37 °C durante 2 h, se añaden varios líquidos con concentraciones específicas (aproximadamente la concentración máxima no tóxica), se proporcionan 6 pocillos duplicados para el cultivo como para cada concentración, 200 µl/pocillo. La inyección de ribavirina y el fosfato de oseltamivir se proporcionan como un grupo de control de fármaco positivo, y se proporciona un grupo de control normal (sin agregar virus y fármacos) y un grupo de control de virus (agregando virus, pero sin fármacos), se observa un impacto del fármaco sobre CPE inducida por virus. Después de 72 h, el valor de OD se mide bajo una longitud de onda de 492 nm utilizando un procedimiento colorimétrico MTT para calcular la tasa efectiva antiviral (%ER) del fármaco. En el software estadístico SPSS 18.0, se comparan diferencias significativas entre las eficiencias antivirales de los distintos

fármacos mediante el uso de un procedimiento ANOVA. %ER = (el valor promedio de OD en el grupo tratado con el fármaco - el valor promedio de OD en el grupo de control de virus)/(el valor promedio de OD en el grupo de control celular - el valor promedio de OD en el grupo de control de virus) × 100%

5 1.3 Resultados de la prueba

(1) TCID₅₀ de varios virus

10 virus de la parainfluenza:
$$\text{LogTCID}_{50} = -2 + 0,5 - \frac{100 + 100 + 50}{100} = -4$$

15 virus de la influenza:
$$\text{LogTCID}_{50} = -2 + 0,5 - \frac{100 + 100 + 50}{100} = -4$$

20 CVB₃:
$$\text{LogTCID}_{50} = -2 + 0,5 - \frac{100 + 100 + 100 + 50}{100} = -5$$

25 HSV-1:
$$\text{LogTCID}_{50} = -2 + 0,5 - \frac{100 + 100 + 100 + 30}{100} = -4.8$$

30 AdV:
$$\text{LogTCID}_{50} = -2 + 0,5 - \frac{100 + 100 + 50}{100} = -4$$

35 RSV:
$$\text{LogTCID}_{50} = -2 + 0,5 - \frac{100 + 100 + 100 + 50}{100} = -5$$

40 CoxA16:
$$\text{LogTCID}_{50} = -2 + 0,5 - \frac{100 + 100 + 100 + 50}{100} = -5$$

45 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 los fármacos

50 Las concentraciones máximas no tóxicas (TC₀), las concentraciones medias tóxicas (TC₅₀) de los fármacos en las células Vero y las concentraciones utilizadas para la prueba antiviral del fármaco se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de la prueba de citotoxicidad de los fármacos (unidad: g/l)

55

Fármaco \ Virus	Sulfato sódico de filigenina	Sulfato potásico de filigenina	Sulfato amónico de filigenina	Ribavirina	Fosfato de oseltamivir
Concentración máxima no tóxica	0,128	0,112	0,105	0,065	0,28
Concentración media tóxica	0,685	0,651	0,555	1,392	0,832
0,30	0,03	0,03	0,03	0,70	0,30

60

65

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

Para conocer las tasas efectivas de los fármacos para resistir varios virus y los resultados del análisis de varianza unidireccional del procedimiento ANOVA, consulte la Tabla 3 para más detalles.

Tabla 3. Tabla estadística de las tasas efectivas antivirales (%ER) de los fármacos

Virus \ Fármaco	Sulfato sódico de filigenina	Sulfato potásico de filigenina	Sulfato amónico de filigenina	Ribavirina	Fosfato de oseltamivir
Virus de la influenza	95,85**	91,22**	90,98**	57,49**	81,76**
Virus de la parainfluenza	98,90**	97,90**	96,95**	97,56**	94,52**
CoxA16	100,00**	100,00**	100,00**	0,70	2,95
RSV	85,41**	82,41**	81,41**	50,08*	37,60
HSV-I	90,82**	88,35**	85,51**	62,92**	66,56**
ADV	20,91**	17,86*	20,88*	0,43	10,31
EV71	50,21	42,10	35,12	4,25**	51,86
CVB ₃	10,55	3,50	7,10	13,44	1,64

Como se muestra en los resultados de la Tabla 3, las tasas efectivas de sulfato sódico de filigenina, sulfato potásico de filigenina y sulfato amónico de filigenina en la inhibición del virus de la influenza, el virus de la parainfluenza, el virus Coxsackie (CoxA16) son todas superiores al 90%, y se compararon con el grupo de control de virus, las diferencias son estadísticamente significativas; las tasas de inhibición para el virus sincitial respiratorio (RSV) y el virus del herpes simple de tipo I (HSV-I) son superiores al 80%, las tasas efectivas son superiores al 80% y, en comparación con el grupo de control del virus, las diferencias son estadísticamente significativas; y los efectos terapéuticos de los tres sulfatos de filigenina en los virus mencionados anteriormente son superiores a las tendencias de la ribavirina y el fosfato de oseltamivir.

2. Prueba antiviral *in vivo*

2.1 Materiales experimentales

(1) Animales experimentales

Los ratones Kunming son proporcionados por el Centro de Ciencias de la Salud Norman Bethune de la Universidad de Jilin, Animal Medicinal No. 10-5219.

2) reactivos de prueba

Nombre del Instrumento	Principales instrumentos experimentales	
	Modelo	Fabricante
Instrumento de PCR Cuantitativa	7300	ABI
Instrumento de PCR	ES-60J	Shenyang Longteng Electronic Weighing Instrument Co., Ltd.
Balanza Analítica Electrónica	FA1004	Shenyang Longteng Co., Ltd.
Incubadora de CO ₂	HG303-5	Nanjing Experimental Instrument Factory
Banco súper limpio	SW-CJ-IF	Suzhou Antai Air Tech 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 A-5082	Australia
Espectrofotómetro	Modelo 7550	Japón

2.2 Procedimiento experimental

(1) Determinación de la dosis letal mediana de ratones debido al virus de la influenza y al virus de la parainfluenza

5 El virus de la influenza y el virus de la parainfluenza (lisado celular) se diluyen por una disminución de 10 veces en líquidos de virus con concentraciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Se obtienen 120 ratones Kunming, 60 de los cuales se proporcionan para el grupo de virus de la influenza y los 60 restantes se proporcionan para el grupo de virus de la parainfluenza, y se dividen aleatoriamente en 6 grupos por separado. Los ratones se anestesian ligeramente con éter y se infectan por vía nasal con líquidos virales que tienen diferentes diluciones a 0,03 ml/ratón.

10 Mientras tanto, se establece un control en blanco y los líquidos del virus se reemplazan con solución salina. La muerte y la supervivencia se consideran los índices de observación, la observación se realiza todos los días durante 14 días después de la infección. Los que murieron dentro de las 24 horas posteriores a la infección son muertes no específicas y, por ende, no se cuentan, el LD_{50} líquido del virus se calcula utilizando un procedimiento

15 de Karber. La fórmula de cálculo es: $\text{Log}LD_{50} = \text{XM} + \frac{1}{2} d - d \frac{\sum P_i}{100}$ [en la que: LD_{50} es la dosis letal mediana; XM es el logaritmo de la mayor concentración de dilución del virus; d es el logaritmo del coeficiente de dilución (múltiple); y $\sum P_i$ es la suma de cada porcentaje de lesión de dilución].

(2) Investigación sobre sulfatos de filigenina sobre la resistencia a la neumonía causada por el virus de la influenza y la infección por el virus de la parainfluenza

1) Animales y grupos experimentales

25 Se adoptan 360 ratones de cuatro semanas para realizar dos pruebas. Se adoptan 180 ratones y se dividen aleatoriamente en 18 grupos (10 para cada grupo) para la prueba de determinación del índice pulmonar y la tasa de inhibición del índice pulmonar de sulfatos de filigenina a los ratones infectados por el virus de la influenza. Los 180 ratones restantes se adoptan y se dividen aleatoriamente en 18 grupos (10 para cada grupo) para una prueba de determinación del título de hemaglutinación del virus de suspensión pulmonar de sulfatos de filigenina.

2) Procedimiento de infección

35 Se coloca un algodón desengrasante en un vaso de precipitados de 200~300 ml, en el que se agrega una cantidad adecuada de éter (solo para humedecer el algodón), el vaso que contiene el algodón desengrasante se invierte al revés, los ratones están extremadamente excitados cuando se anestesian allí, y se hace que se acuesten boca arriba cuando están notoriamente débiles, los ratones se infectan por vía nasal con el virus de la influenza $15LD_{50}$ y el virus de la parainfluenza a 0,03 ml/fosa nasal, y la suspensión del virus se reemplaza con solución salina normal en el grupo de control normal.

3) Procedimiento de administración y dosis de administración

40 La administración intragástrica convencional se lleva a cabo respectivamente para los grupos farmacológicos con sulfato sódico de filigenina y sulfato de potasio de filigenina y el grupo de control de ribavirina un día antes de la infección. Las dosis de administración alta, media y baja del sulfato sódico de filigenina y del sulfato potásico de filigenina son 13,0 mg/kg, 6,5 mg/kg y 3,25 mg/kg respectivamente, y la dosis de administración del fármaco positivo de ribavirina es 58,5 mg/kg. La administración se realiza una vez al día durante cinco días consecutivos. El grupo de control de virus está empapado con solución salina normal del mismo volumen.

4) Índice de observación

50 ① Determinación del índice pulmonar

55 En el quinto día después de que se administran los fármacos a los ratones, los ratones son inhibidos de beber agua durante 8 horas primero; luego, después de pesar a los ratones, se les mueven los ojos y los animales se asesinan por desangrado; sus cavidades torácicas se abren para extraer los pulmones totales, que se lavan con solución salina normal dos veces y absorben la humedad de las superficies de los pulmones con papel de filtro; luego se pesan los pulmones usando una balanza electrónica, y el índice pulmonar y la tasa de inhibición del índice pulmonar se calculan de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\text{índice pulmonar} = (\text{peso pulmonar de los ratones} / \text{peso de los ratones}) \times 100\%$$

$$\text{tasa de inhibición del índice pulmonar} = (\text{índice pulmonar promedio del grupo modelo de infección} - \text{índice pulmonar promedio del grupo experimental}) / \text{índice pulmonar promedio del grupo modelo de infección} \times 100\%$$

65 ② Determinación del título de hemaglutinación del virus de suspensión pulmonar

Se toman diversos grupos de pulmones de ratones respectivamente en el quinto día después del tratamiento, y se homogeneizan en un homogeneizador a baja temperatura; el homogenado se diluye en 10% de suspensión de tejido pulmonar con solución salina normal; la centrifugación se realiza para obtener un sobrenadante, que se diluye doblemente y se gotea a una placa de titulación con 0,2 ml/pocillo; se añaden 0,2 ml de suspensión de eritrocitos de pollo al 1% en cada orificio y se mezclan bien; la placa de titulación se coloca en un ambiente a temperatura ambiente durante 30 minutos para observar y registrar los títulos de hemaglutinación. El punto final aparece cuando el eritrocito se aglutina para ser (++), y su título se expresa mediante el múltiple de dilución de la suspensión.

10 ③ Observación de histomorfología pulmonar

Se toman varios pulmones de ratones respectivamente en el quinto día después del tratamiento. Los cambios patológicos generales de sus vísceras se observan a simple vista y se registran. Los pulmones se limpian enjuagando con solución salina normal y la humedad se absorbe utilizando papel de filtro; una porción del pulmón se fija con formaldehído al 10%, embebido en parafina, en rodajas y con cepas HE. La observación y la fotografía se realizan bajo un microscopio.

2.3 Resultados experimentales y análisis

20 (1) Resultado de la determinación de la dosis letal mediana en ratones debido al virus de la influenza y al virus de la parainfluenza

Los ratones Kunming en los grupos experimentales se infectan respectivamente por vía nasal con 30 µl de virus del virus de la influenza y líquidos del virus de la parainfluenza de diferentes concentraciones; en el tercer día de infección, todos los ratones en los primeros tres grupos (grupo 10⁻¹, grupo 10⁻² y grupo 10⁻³ según las concentraciones de virus) experimentan síntomas de enfermedad de diferentes grados: pelaje pilomotor, temblores, disminución del apetito, etc. en el quinto día, los ratones tropiezan; en el sexto día, los ratones del grupo de mayor concentración de virus comienzan a morir, y la muerte ocurre sucesivamente en los grupos restantes en el séptimo día después de la infección. Una vez completada la observación de 14 días, se cuenta la mortalidad de los ratones de cada grupo, cuyos resultados se muestran en las Tablas 3 y 4. Según el cálculo, el virus de la influenza es una dilución de 10^{-2,9}, y del virus de la parainfluenza es una dilución de 10^{-2,5}.

Tabla 3. Estadísticas de resultados de pruebas de dosis letal mediana del virus de la influenza

Grupo de virus de la influenza	Mortalidad acumulada	Supervivencia acumulada	Tasa 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 en blanco	0	10	0%

El LD₅₀ del virus se calcula utilizando un procedimiento de Karber. El LogLD₅₀ del virus de la influenza es el siguiente:

$$\text{LogLD}_{50} = X_M + \frac{1}{2} d - d \frac{\sum P_i}{100} = -1 + 0,5 - (80\% + 60\% + 40\% + 20\% + 0\% + 0\%) = -2,9$$

Tabla 4. Estadísticas de resultados de pruebas de dosis letal mediana del virus de la parainfluenza

Grupo del virus de la parainfluenza	Mortalidad acumulada	Supervivencia acumulada	Tasa 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 en blanco	0	10	0%

El LD₅₀ del virus se calcula utilizando un procedimiento de Karber. El LogLD₅₀ del virus de la parainfluenza es el siguiente:

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

(2) Resultados de los efectos de los sulfatos de filigenina en la resistencia a la neumonía causada por el virus de la influenza y las infecciones por el virus de la parainfluenza

① Determinación del índice pulmonar

Después de que los ratones se infectan con el virus de la influenza y el virus de la parainfluenza, el resultado promedio del índice pulmonar muestra que: en comparación con el grupo modelo de infección, los índices pulmonares del grupo control normal, los grupos de fármacos con diversas concentraciones y el grupo ribavirina disminuyen significativamente ($P < 0,05$); cuando la concentración del sulfato de filigenina está dentro del intervalo de 3,25 a 13,0 mg/kg/día, se logra un cierto efecto protector y todos los índices pulmonares disminuyen significativamente. Aunque la disminución en el grupo de dosificación alta de sulfato de filigenina es más significativa en comparación con otros dos grupos, no hay diferencias significativas entre los distintos grupos en comparación ($P > 0,05$). Los grupos de dosificación media y alta de sulfatos de filigenina son superiores al grupo de ribavirina ($P > 0,05$). Para los resultados, consulte las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Impacto de los sulfatos de filigenina en el índice pulmonar de ratones infectados con el virus de la influenza y la tasa de inhibición del índice pulmonar

Grupos	Número de animales	Dosificación del fármaco (mg/kg/día)	Índice pulmonar ($\bar{X} \pm S$)	Tasa de inhibición del índice pulmonar (%)	Valor P	Valor P
Grupo de control normal	10	0	1,274 ± 0,107	-	*<0,05	#>0,05
Grupo de control de virus	10	0	1,488 ± 0,088	-		#<0,05
Grupo de ribavirina	10	58,5	1,282 ± 0,064	13,84	*<0,05	
Grupo de dosificación alta de sulfato sódico de filigenina	10	13,0	1,1809 ± 0,57	20,73	*<0,05	#>0,05
Grupo de dosificación media de sulfato sódico de filigenina	10	6,5	1,264 ± 0,051	15,03	*<0,05	#>0,05
Grupo de dosificación baja de sulfato sódico de filigenina	10	3,25	1,344 ± 0,035	9,69	*<0,05	#>0,05
Grupo de dosificación alta de sulfato potásico de filigenina	10	13,0	1,190 ± 0,061	20,03	*<0,05	#>0,05
Grupo de dosificación media de sulfato potásico de filigenina	10	6,5	1,262 ± 0,058	15,22	*<0,05	#>0,05
Grupo de dosificación baja de sulfato potásico de filigenina	10	3,25	1,343 ± 0,044	9,77	*<0,05	#>0,05

* representa la comparación con el grupo de control de virus; # representa la comparación con el grupo de ribavirina

Tabla 6. Impacto de los sulfatos de filigenina en el índice pulmonar de ratones infectados con el virus de la parainfluenza y la tasa de inhibición del índice pulmonar

Grupos	Número de animales	Dosificación del fármaco (mg/kg/día)	Índice pulmonar ($\bar{X} \pm S$)	Tasa de inhibición del índice pulmonar (%)	Valor P	Valor P
Grupo de control normal	10	0	1,312 ± 0,046	-	*<0,05	#>0,05
Grupo de control de virus	10	0	1,598 ± 0,071	-		#<0,05
Grupo de ribavirina	10	58,5	1,392 ± 0,070	12,89	*<0,05	
Grupo de dosificación alta de sulfato sódico de filigenina	10	13,0	1,331 ± 0,073	16,73	*<0,05	#>0,05
Grupo de dosificación media de sulfato sódico de filigenina	10	6,5	1,303 ± 0,062	18,46	*<0,05	#>0,05

Grupos	Número de animales	Dosificación del fármaco (mg/kg/día)	Índice pulmonar (X ± S)	Tasa de inhibición del índice pulmonar (%)	Valor P	Valor P	
5	Grupo de dosificación baja de sulfato sódico de filigenina	10	3,25	1,311 ± 0,049	17,96	*<0,05	#>0,05
10	Grupo de dosificación alta de sulfato potásico de filigenina	10	13,0	1,308 ± 0,085	18,13	*<0,05	#>0,05
	Grupo de dosificación media de sulfato potásico de filigenina	10	6,5	1,286 ± 0,078	19,55	*<0,05	#>0,05
15	Grupo de dosificación baja de sulfato potásico de filigenina	10	3,25	1,259 ± 0,041	17,10	*<0,05	#>0,05
* representa la comparación con el grupo de control de virus; # representa la comparación con el grupo de ribavirina							

© Determinación del título de hemaglutinación del virus de suspensión pulmonar

20 Después de que los ratones se infectan con el virus de la influenza y el virus de la parainfluenza, los títulos de hemaglutinación del tejido pulmonar (lnX) del grupo modelo de infección son respectivamente 32,33 y 33,86, después del tratamiento con sulfato de filigenina de diferentes concentraciones durante 5 días, el tejido pulmonar los títulos de hemaglutinación del virus disminuyen en cierta medida; en comparación con el grupo modelo de infección, la diferencia es significativa (P < 0,05). En comparación con el grupo de ribavirina, los títulos de hemaglutinación del virus de los grupos de dosificación alta, media y baja de sulfatos de filigenina son todos más altos que los del grupo de ribavirina, las diferencias son significativas (P < 0,05); después de la comparación, el título de hemaglutinación del grupo de dosificación alta de sulfatos de filigenina es significativamente diferente de los de los otros dos grupos (P < 0,05), como se muestra en la Tabla 10. Tras la comparación, no se observa diferencia significativa entre el grupo de dosificación alta de los sulfatos de filigenina y el grupo de ribavirina de los ratones infectados con el virus de la parainfluenza (P > 0,05), los grupos de dosificación media y baja de sulfatos de filigenina son superiores al grupo de ribavirina, las diferencias son significativas (P < 0,05); en comparación, el título de hemaglutinación del grupo de dosificación alta de sulfatos de filigenina es significativamente diferente del grupo de dosis baja de sulfatos de filigenina (P > 0,05), como se muestra en las Tablas 7 y 8.

35 **Tabla 7.** Impacto de los sulfatos de filigenina en el título de hemaglutinación de la suspensión pulmonar de los ratones infectados con el virus de la influenza

Grupos	Número de animales	Dosificación del fármaco (mg/kg/día)	Título de hemaglutinación (lnX)	Valor P	Valor P	
40	Grupo de control normal	10	0	*<0,05	*<0,05	
45	Grupo de control de virus	10	0		#<0,05	
	Grupo de ribavirina	10	58,5	21,13 ± 0,986	*<0,05	
50	Grupo de dosificación alta de sulfato sódico de filigenina	10	13,0	20,07 ± 0,646	*<0,05	#<0,05
	Grupo de dosificación media de sulfato sódico de filigenina	10	6,5	21,29 ± 0,504	*<0,05	#<0,05
55	Grupo de dosificación baja de sulfato sódico de filigenina	10	3,25	23,93 ± 0,392	*<0,05	#<0,05
	Grupo de dosificación alta de sulfato potásico de filigenina	10	13,0	19,95 ± 0,595	*<0,05	#<0,05
60	Grupo de dosificación media de sulfato potásico de filigenina	10	6,5	21,06 ± 0,515	*<0,05	#<0,05
	Grupo de dosificación baja de sulfato potásico de filigenina	10	3,25	22,11 ± 1,012	*<0,05	#<0,05
* representa la comparación con el grupo de control de virus; # representa la comparación con el grupo de ribavirina						

65

Tabla 8. Impacto de sulfatos de filigenina en el título de hemaglutinación de la suspensión pulmonar de los ratones infectados con el virus de la parainfluenza

Grupos	Número de animales	Dosificación del fármaco (mg/kg/día)	Título de hemaglutinación (lnX)	Valor P	Valor P
Grupo de control normal	10	0	0	*<0,05	*<0,05
Grupo de control de virus	10	0	33,86 ± 1,264		#<0,05
Grupo de ribavirina	10	58,5	26,73 ± 1,193	*<0,05	
Grupo de dosificación alta de sulfato sódico de filigenina	10	13,0	19,82 ± 0,981	*<0,05	#>0,05
Grupo de dosificación media de sulfato sódico de filigenina	10	6,5	21,01 ± 0,614	*<0,05	#<0,05
Grupo de dosificación baja de sulfato sódico de filigenina	10	3,25	23,26 ± 0,991	*<0,05	#<0,05
Grupo de dosificación alta de sulfato potásico de filigenina	10	13,0	20,91 ± 0,825	*<0,05	#>0,05
Grupo de dosificación media de sulfato potásico de filigenina	10	6,5	22,05 ± 0,829	*<0,05	#<0,05
Grupo de dosificación baja de sulfato potásico de filigenina	10	3,25	23,88 ± 0,953	*<0,05	#<0,05

* representa la comparación con el grupo de control de virus; # representa la comparación con el grupo de ribavirina

③ Resultados de detección de histología pulmonar

Los pulmones de los ratones en el grupo modelo del virus de la influenza y del virus de la parainfluenza están principalmente congestionados, sufrieron lesiones por edema; algunos de los pulmones resultan ser áreas de consolidación con apariencia de color marrón oscuro, los más afectados aparecen focos hemorrágicos de color rojo parduzco. Microscópicamente, se puede ver que tanto el pulmón intersticial, como los bronquios, los bronquiolos y las paredes alveolares, sufren congestión, edema y linfocitos, infiltración de células mononucleares, ensanchamiento de la pared alveolar y reacción inflamatoria de los alvéolos pulmonares. Después de que los modelos de ratones con neumonía por virus de la influenza y virus de la parainfluenza se tratan con sulfato de filigenina, los cambios patológicos generales de los pulmones de cada grupo de ratones se reducen significativamente, y algunos de los tejidos pulmonares tienen forma y estructura normales; en comparación con el grupo modelo de infección, el tabique alveolar es más delgado, el número de infiltración de las células mononucleares de la pared alveolar y la pared del bronquiolo es menor, no hay fugas en la cavidad y las lesiones se reducen significativamente. En comparación con el grupo modelo de infección, los grupos de dosificación media y alta del sulfato de filigenina en el tratamiento de la neumonía por el virus de la parainfluenza tienen un tabique alveolar significativamente más delgado, menor número de infiltración de células mononucleares, sin fugas en la cavidad y lesiones significativamente reducidas.

Los resultados del examen microscópico de corte patológico de tejido pulmonar de ratón del modelo de neumonía por virus de la influenza se muestran en la Figura 1. La Figura 1A muestra el tejido pulmonar de un ratón normal; La Figura 1B muestra el tejido pulmonar de un ratón con neumonía por virus de la influenza. La Figura 1C muestra el tejido pulmonar del ratón del modelo de ratón con neumonía por virus de la influenza después de haber sido tratado con fármaco positivo ribavirina. La Figura 1D muestra el tejido pulmonar del ratón del modelo de ratón con neumonía por virus de la influenza después de haber sido tratado con sulfatos de filigenina en dosis altas. La Figura 1E muestra el tejido pulmonar del ratón del modelo de ratón con neumonía por virus de la influenza después de haber sido tratado con dosis medias de sulfatos de filigenina. La Figura 1F muestra el tejido pulmonar del ratón del modelo de ratón con neumonía por virus de la influenza después de haber sido tratado con dosis bajas de sulfatos de filigenina.

Los resultados del examen microscópico de corte patológico de tejido pulmonar de ratón del modelo de neumonía por virus de la parainfluenza se muestran en la Figura 2. La Figura 2A muestra el tejido pulmonar de un ratón normal. La Figura 2B muestra el tejido pulmonar de un ratón con neumonía por virus de la parainfluenza. La Figura 2C muestra el tejido pulmonar del ratón del modelo de ratón con neumonía por virus de la parainfluenza después de haber sido tratado con fármaco positivo ribavirina. La Figura 2D muestra el tejido pulmonar del ratón del modelo de ratón con neumonía por virus de la influenza después de haber sido tratado con sulfatos de filigenina en dosis altas. La Figura 2E muestra el tejido pulmonar del ratón del modelo de ratón con neumonía por virus de la parainfluenza después de haber sido tratado con sulfatos de filigenina de dosis media. La Figura 2F muestra el

tejido pulmonar del ratón del modelo de ratón con neumonía por virus de la parainfluenza después de haber sido tratado con sulfatos de filigenina en dosis bajas.

2.4 Conclusiones

5 Los resultados de las pruebas antivirales *in vivo* muestran que los sulfatos de filigenina (sulfato de sodio de filigenina y sulfato de potasio de filigenina) tienen efectos de inhibición relativamente significativos sobre el virus de la influenza y el virus de la parainfluenza, así como la neumonía viral de ratones causada por ello en un intervalo de dosificación de 3,25 mg/kg/da 13 mg/kg/día, puede reducir significativamente el índice pulmonar y el título de hemaglutinación del mismo, también mejora significativamente la patología del tejido pulmonar y tiene una diferencia significativa en comparación con el grupo de control modelo.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

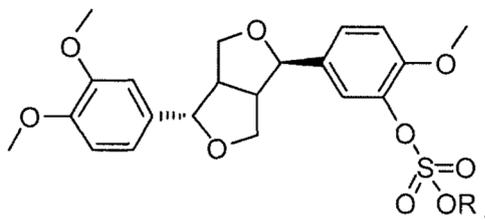
55

60

65

REIVINDICACIONES

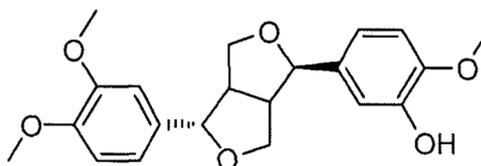
1. Un sulfato de filigenina como se representa por la siguiente fórmula estructural química:



en la que R es H, Na⁺, K⁺, NH₄⁺, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metil amino, dimetilamino, trimetilamino, trietilamino, dietilamino, etilamino, etanolamino, dietanolamino, piperidilo, piperazinilo o pirazinilo.

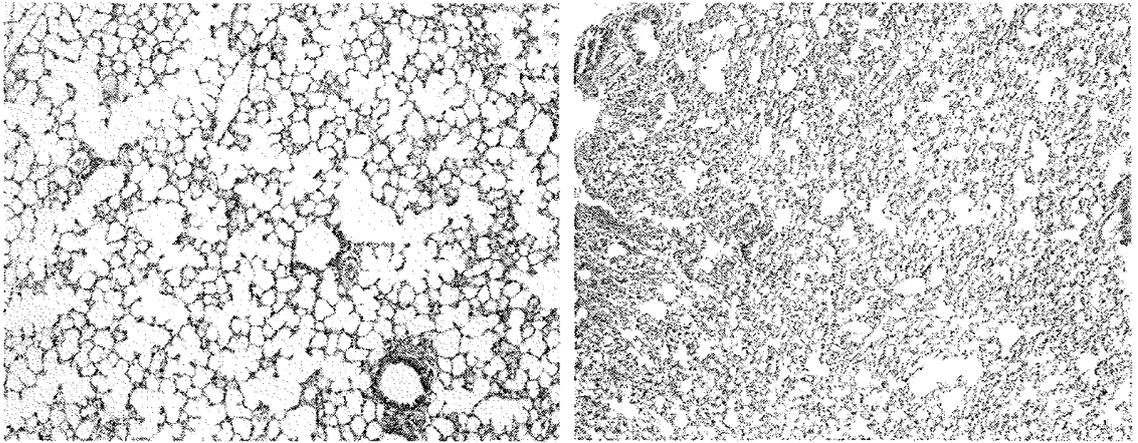
2. Un procedimiento de preparación del sulfato de filigenina de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas realizadas secuencialmente:

1) disolver un filigenol en un solvente orgánico para obtener una solución de filigenol, en el que el filigenol está representado por la siguiente fórmula estructural química:



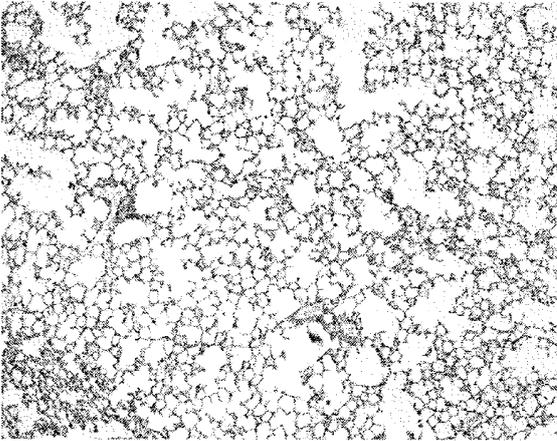
2) primero agregar un agente sulfatante en la solución de filigenol y mezclar bien; y luego, llevar a cabo una reacción de esterificación para obtener una mezcla de producto líquido;
3) agregar una base para ajustar el valor de pH de la mezcla líquida a 8-10; y
4) separar y purificar la mezcla líquida para obtener el producto final.

3. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el agente sulfatante en la etapa 2) se selecciona del grupo que consiste en ácido clorosulfónico, complejo de trióxido de azufre-trietilamina, complejo de trióxido de azufre-piridina y complejo de trióxido de azufre-trimetilamina.
4. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que la base en la etapa 3) se selecciona del grupo que consiste en base orgánica y base inorgánica.
5. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que el solvente orgánico en la etapa 1) se selecciona del grupo que consiste en piridina, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida y diclorometano.
6. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que el agente sulfatante se agrega en la solución de filigenol a una temperatura de 0-5 °C en la etapa 2).
7. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que una relación molar del filigenol en la solución de filigenol al agente sulfatante agregado a la solución de filigenol en la etapa 2) es 1:1-10.
8. Uso del sulfato de filigenina de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de medicamentos antivirales.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los medicamentos antivirales se seleccionan del grupo que consiste en medicamentos contra la influenza, medicamentos contra la parainfluenza, medicamentos contra el virus sincitial respiratorio, medicamentos contra el virus del herpes simple de tipo I y medicamentos contra el virus Coxsackie A16.
10. Medicamento antiviral **caracterizado por** contener un sulfato de filigenina de acuerdo con la reivindicación 1.

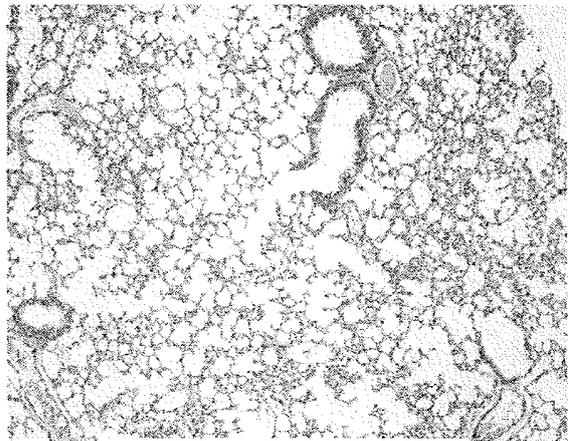


1A

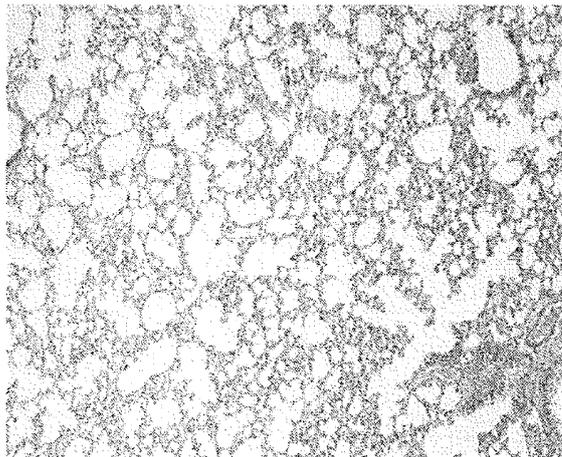
1B



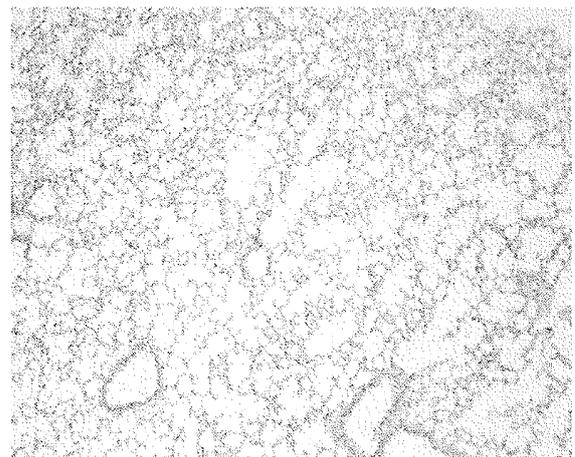
1G



1D

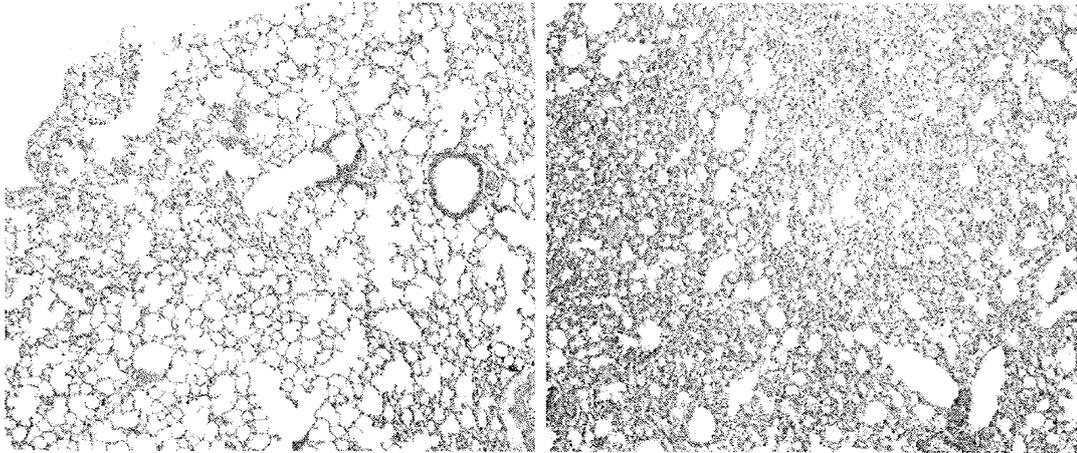


1E



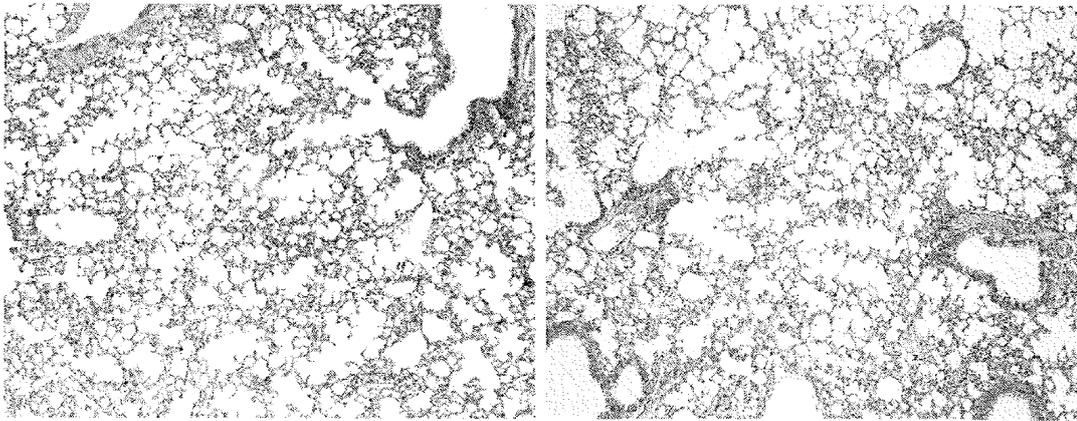
1F

FIG. 1



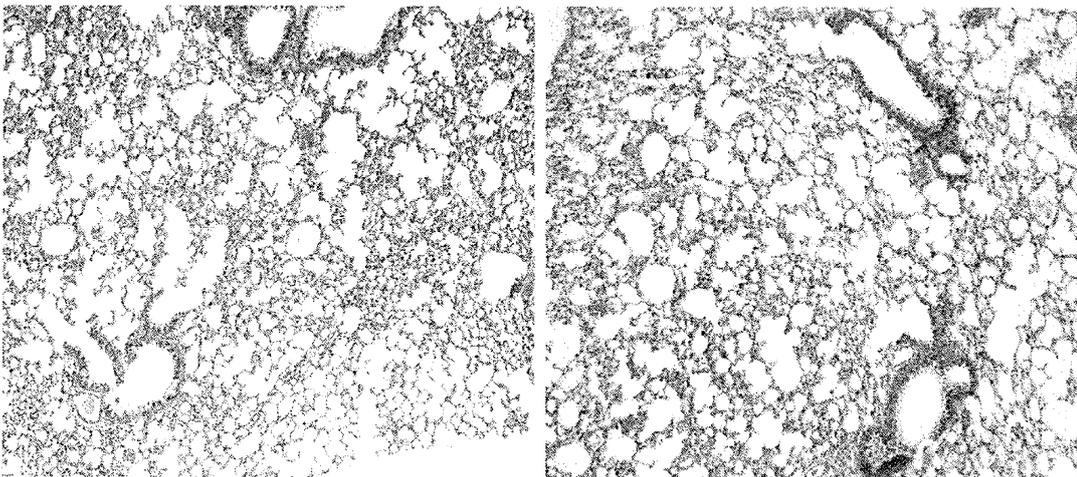
2A

2B



2C

2D



2E

2F

FIG. 2