

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 302**

51 Int. Cl.:

C07H 1/00 (2006.01)

C07H 15/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2014 PCT/CN2014/094656**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16019682**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2014 E 14899256 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3178834**

54 Título: **Procedimiento de síntesis química de filirina**

30 Prioridad:

07.08.2014 CN 201410386621

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

15.04.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FAN, HONGYU

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 819 302 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

Procedimiento de síntesis química de filirina

Campo técnico

5 La invención pertenece al campo de la química farmacológica y, en particular, se refiere a un procedimiento de síntesis química para la filirina.

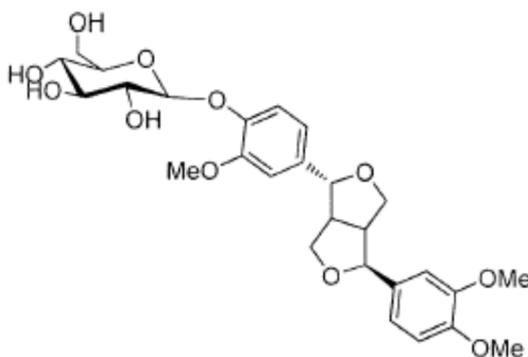
Las ventajas y valores prácticos del procedimiento de síntesis química de la filirina radican en: la materia prima es fácil de obtener, los catalizadores para la glicosilación son baratos y fáciles de obtener, el costo de producción se reduce considerablemente y se puede usar para producción industrial.

Antecedentes de la técnica

10 Fructus Forsythiae son frutos secos de *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl (Oleaceae), que se cultiva principalmente en las provincias de Henan, Shanxi, Shandong y otros lugares de China, así como en las provincias de Hubei, Hebei, Sichuan and Gansu provinces. *Forsythiae* se usa comúnmente para tratar enfermedades de resfriado común agudo por viento-calor, ántrax y llagas, linfadenitis tuberculosa, infección del tracto urinario, etc. Un ingrediente principal de *Fructus forsythia*(*forssythia*) es filirina con antivirales, antibacterianos, antioxidantes, eliminación de radicales libres, efectos antitumorales y otros efectos farmacológicos. En la actualidad, se han reportado numerosas investigaciones sobre la extracción de filirina a partir de *forssitia* natural (*Phytochemical Analysis*, vol. 21 (3), 2010, páginas 253-260), los recursos de plantas medicinales se vuelven cada vez más escasos y el contenido efectivo de ingredientes es relativamente bajo, de este modo, la síntesis química de filirina puede reducir considerablemente los costes, mejorar el rendimiento y desempeñar un papel en la protección de los recursos vegetales.

15

20



La síntesis química de filirina se ha investigado, en 2014, Fan Hongyu et al. usó 1-bromo-tetra-o-acetilalfa-D-glucosa y filigenina para llevar a cabo la glicosilación catalizada por un catalizador de transferencia de fase y una base y usó metóxido de sodio para la desprotección para generar filirina [Fan Hongyu, Fu Li, *Synthesis and Structure Characterization of Filirina*, Liaoning Chemical Industry, 2014, 43, 241-243], sin embargo, el rendimiento de síntesis del procedimiento es relativamente bajo, se requiere que la solución de penta-acetil-beta-D-glucosa y ácido bromhídrico al 33% de ácido acético sean bromados para obtener el 1-bromo-tetra-o-acetil-alfa-D-glucosa, y el ácido bromhídrico no facilitan la operación por su corrosión.

25

30

Sumario de la invención

La invención proporciona un procedimiento de síntesis de filirina, destinado a resolver los problemas técnicos en un procedimiento de síntesis química existente de filirina. El procedimiento de la invención puede superar los defectos de la técnica anterior con el alto rendimiento de un producto sintetizado filirina. El procedimiento de la invención tiene una operación y un procedimiento tecnológico simples, un período de producción corto, un alto contenido de filirina en el producto sintetizado, un alto rendimiento y un coste de producción de filirina obviamente reducido, y es aplicable a la preparación de lotes y la producción industrial.

35

Para los propósitos de la invención, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de síntesis química para la filirina, que comprende las siguientes etapas:

1) disolver un receptor de glicosilo filirina y un donante de glicosilo en el primer disolvente orgánico y realizar la glicosilación en presencia de un catalizador y un tamiz molecular bajo protección de un gas inerte para obtener tetraacil filirina;

40

2) disolver la tetraacil filirina en el segundo disolvente orgánico, luego agregar metóxido de sodio para la desacilación, agregar un ajustador de pH ácido para regular el valor de pH de una mezcla de reacción a neutral y realizar un tratamiento de purificación para obtener filirina;

5 en el que la temperatura de glicosilación en la etapa 1) es 0-20 °C, preferiblemente 0-10 °C, y más preferiblemente 0 °C; el tiempo de reacción de la glicosilación en la etapa 1) es 4-15 h, preferiblemente de 8-10 h, y más preferiblemente de 10 h; el catalizador es un ácido de Lewis; el tamiz molecular es un tamiz molecular de aluminosilicato o polvo de aluminosilicato; se usa tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acil-D-glucopiranosilo como donante de glicosilo; se usa diclorometano, triclorometano, 1,2-diclorometano o tolueno, preferiblemente diclorometano, como primer disolvente orgánico; y el segundo disolvente orgánico es una solución mixta de
10 diclorometano y metanol.

En particular, se usa tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosilo o tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-D-glucopiranosilo, tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-D-glucopiranosilo (donante de glicosilo descrito en J. of Shenyang Pharm., Vol. 28 (9), 2011, páginas 707-711). En particular, la proporción molar del tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acil-D-glucopiranosilo a filigenina es 1,0-5,0:1.

15 En particular, durante la glicosilación de la invención, la cantidad de uso del donante de glicosilo tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acil-D-glucopiranosilo es pequeña, el rendimiento de un producto de glicosilación es bajo, subproductos aumentará mientras se aumenta la cantidad de uso, y la proporción molar del donante de glicosilo, tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acil-D-glucopiranosilo a filigenina es preferiblemente 1,5-2,5:1.

20 En particular, uno o más de haloacetamidas C₃-C₉, silil fluorohidrocarbilo sulfonato C₂-C₈, fluorohidrocarbilo sulfonato de plata C₁-C₆ y eterato de trifluoruro de boro, preferiblemente N-yodosuccinimida, trifluorometanosulfonato de plata, triflato de trimetilsililo o eterato de trifluoruro de boro, y más preferiblemente trifluorometanosulfonato de plata, triflato de trimetilsililo y eterato de trifluoruro de boro, se usan como catalizadores de ácido de Lewis

En particular, la proporción molar del catalizador ácido de Lewis al donante de glicosilo tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acil-D-glucopiranosilo es 1:1,0-10,0.

25 La baja cantidad de uso del catalizador ácido de Lewis conduce a la descomposición del donante de glicosilo tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acil-D-glucopiranosilo y rendimiento reducido; una gran cantidad de uso del catalizador ácido de Lewis conduce a la descomposición de un donante de glicosilo, tetraacil filirina, y reduce el rendimiento.

30 En particular, la proporción molar del catalizador ácido de Lewis al donante de glicosilo, tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acil-D-glucopiranosilo es preferiblemente 1:5,0-10,0, más preferiblemente 1:5-6, y aún más preferiblemente 1:5.

En particular, el gas protector inerte es nitrógeno, argón o helio, preferiblemente nitrógeno.

En particular, se usa un tamiz molecular de aluminosilicato de tipo 3Å-5Å, preferiblemente un tamiz molecular de aluminosilicato de tipo 4Å como tamiz molecular de aluminosilicato.

35 Más particularmente, la cantidad de uso del tamiz molecular cumple con el requisito de que la proporción de masa del tamiz molecular con respecto a la filigenina sea de 1 a 10:1, preferiblemente de 2:1.

En particular, el procedimiento también comprende una etapa 1A) de inactivación de la glicosilación mediante un agente inactivador antes de que se disuelva tetraacil filirina en el segundo disolvente orgánico.

En particular, se usa trimetilamina, trietilamina o tiosulfato de sodio como agente de inactivación.

40 En particular, la cantidad de uso del agente de inactivación cumple con el requisito de que la proporción molar del agente de inactivación al ácido de Lewis sea 1:1-3, preferiblemente 1:1-1,5, y más preferiblemente 1:1.

En particular, la proporción en volumen de diclorometano a metanol en la solución mixta de diclorometano y metanol es 1:1-10, preferiblemente 1: 2.

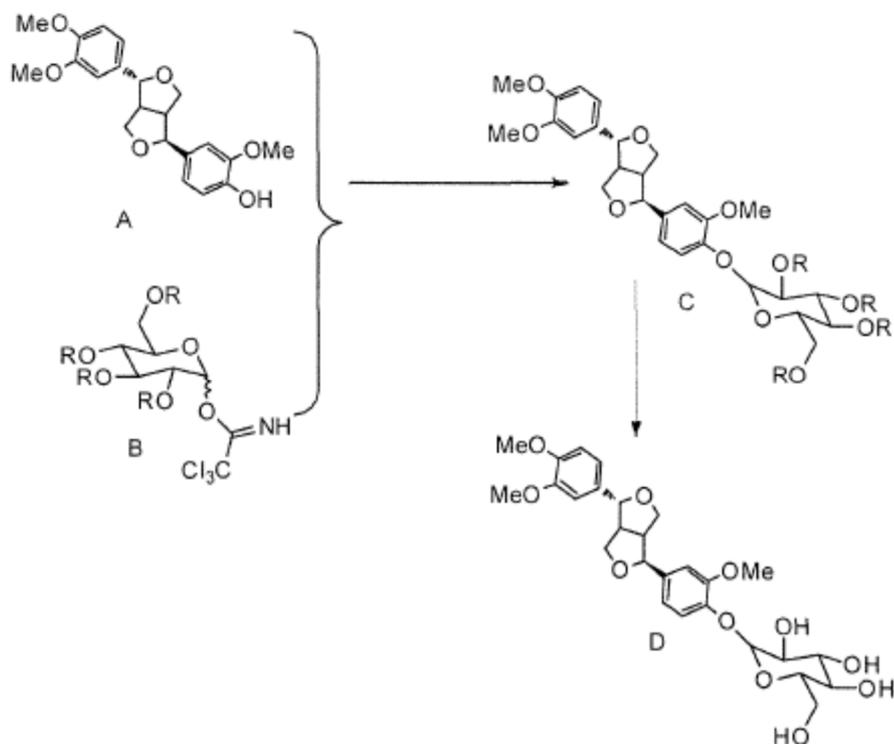
45 En particular, la proporción molar de metóxido de sodio a tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acil-D-glucopiranosilo es 1: 300-500, preferiblemente 1: 375-500.

En particular, el tiempo de desacilación es 4-12 h, preferiblemente 4 h.

En particular, se usa ácido acético, ácido propiónico o ácido clorhídrico, preferiblemente ácido acético, como ajustador de pH ácido.

Más particularmente, el valor de pH de la mezcla de reacción se ajusta a 6-7.

La fórmula de reacción química de la síntesis química de filirina en la invención es la siguiente:



en la que la fórmula estructural A es filigenina; la fórmula estructural B es tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acil-D-glucopiranosilo; la fórmula estructural C es tetra-acilfilirina; la fórmula estructural D es filirina.

- 5 Las ventajas y los valores prácticos del procedimiento de síntesis química para la filirina de la invención radican en: la materia prima es fácil de obtener, los catalizadores para la glicosilación son baratos y fáciles de obtener, el coste de producción se reduce considerablemente y se puede ser usar para la producción industrial.

Descripción detallada de la invención

- 10 La invención se describirá adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, sin embargo, estos ejemplos son meramente ilustrativos de la presente invención y no se deben interpretar como límites al alcance de la presente invención. Además, los reactivos y materias primas de los ejemplos se pueden obtener comercialmente, si hay omisiones, se pueden consultar las directrices de síntesis orgánica, las directrices de la administración de fármacos y las instrucciones de los fabricantes de reactivos y aparatos correspondientes.

Realización 1

15 1) Glicosilación

- 20 Se alimentan filigenina (372 mg, 0,001 mol) y tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosilo (738 mg, 0,0015 mol) en un matraz de tres bocas de 100 ml, en cuya proporción molar de filigenina a tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosilo es 1:1,5, se agregan 20 ml de diclorometano anhidro y un tamiz molecular de aluminosilicato de tipo 4Å (744 mg) al matraz, luego se introduce nitrógeno como gas inerte en el matraz para protección del gas inerte, seguido de agitación durante 0,5 h, después de mezclar uniformemente, se agrega gota a gota trimetilsililtrifato como catalizador ácido de Lewis (TMSOTf, 0,06 ml, 0,312 mmol), en el cual la proporción molar del catalizador de ácido de Lewis para tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosilo es 1:5, la proporción de masa del tamiz molecular a filigenina es 2:1, la mezcla resultante se somete a glicosilación durante 10 h a 0 °C con agitación;

- 25 el intermedio reactivo obtenido de la deshidrogenación de grupos hidroxilo de un sustrato de reacción filigenina con ácido de Lewis se puede oxidar cuando se expone al oxígeno, la posibilidad de que el intermedio se exponga al oxígeno se elimina mediante protección con gas inerte para asegurar la reacción normal; dado que la glicosilación puede producir agua, el tamiz molecular se agrega con el fin de eliminar el agua resultante de la reacción para asegurar la reacción normal, mientras que el TMSOTf se puede descomponer con agua, se agrega el tamiz molecular para asegurar aún más la reacción normal.
- 30

2) Tratamiento de inactivación

Se agrega trietilamina como agente de inactivación (0,312 mmol) a la mezcla de reacción para inactivar la glicosilación, en la que la proporción molar de trietilamina como agente de inactivación a trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (es decir, triflato de trimetilsililo) como catalizador de ácido de Lewis es 1:1; luego, la mezcla de glicosilación inactivada se filtra usando un embudo Buchner, el filtrado se concentra y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = 3:2 (v/v)), para obtener tetraacetil filirina;

3) Tratamiento de desacilación

3-1) Se disuelve tetraacetil filirina en 30 ml de una mezcla de diclorometano y metanol, en la que la proporción en volumen de diclorometano a metanol es 1:2, luego se agrega metóxido de sodio (0,22 mg, 0,004 mmol), en cuya proporción molar de metóxido de sodio a tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosilo es 1:375, seguido de una reacción de diacilación durante 4 h con agitación, luego se agrega ácido acético como ajustador de pH para ajustar el valor de pH de la mezcla resultante de la reacción de desacilación a 6;

Durante la reacción de desacilación de la presente invención, el metóxido de sodio agregado no provoca la destrucción de enlaces glicosídicos inducida por alcalinidad y también sirve como base para la reacción de desacilación para eliminar los grupos protectores de acilo y de este modo promover el procedimiento de glicosilación. El tiempo de la reacción de desacilación es de al menos 4 h, preferiblemente de 4 a 12 h.

En la invención, se agrega ácido acético a la mezcla desacilada para ajustar el pH de la mezcla y neutralizar el exceso de metóxido de sodio, terminando la reacción, además, debido a una actividad moderada, el ácido acético no rompe los enlaces glicosídicos generados y podría aumentar el rendimiento del producto. 3-2) la mezcla resultante se concentra al vacío con un rotavapor para eliminar los disolventes por evaporación, seguido de purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: cloroformo/metanol = 8:2 (v/v)), se obtienen 400,5 mg de filirina sólida de color blanco con un rendimiento total del 79,8%.

El sólido de color blanco tiene un punto de fusión de 181-183 °C y es soluble en cloroformo y metanol. Tiene la misma propiedad física que la sustancia estándar de filirina (comprada en The National Institute For Food and Drug Control), mantiene el punto de fusión sin cambios después de mezclarse con la sustancia estándar de filirina y tiene datos espectrales y espectrométricos de masas que son consistentes con los de filirina informados en artículos de estudio, por lo que este compuesto se identifica como filirina.

De acuerdo con la HPLC enumerada en Appendix VI D to First Volume of Chinese Pharmacopoeia(ChP,2000), la pureza de la filirina preparada es del 99,5%.

ESI-MS, m/z [M-H] es 533, el peso molecular es 534.

¹HRMN(600MHz,d6-DMSO) δ: 7,66(br,1H,OH), 7,49(d,1H,J=8,43Hz), 7,21

(br,2H), 7,14(s,1H), 7,13(s,1H), 7,01(d,1H,J=7,89Hz), 6,92(d,1H,J=8,12Hz), 6,88 (d,1H,J=8,34Hz), 6,54(br,1H), 5,60(d,1H,J=7,03Hz), 4,82(d,1H,J=5,92Hz), 4,54

(d,1H,J=6,78Hz), 4,42(d,1,1,43Hz), 4,25(m,4H), 4,13(d,1H,J=9,18Hz), 4,01

(br,1H), 3,90(t,1H,J=8,72Hz), 3,75(dd,1H,J=8,99Hz,6,43Hz), 3,68(s,3H), 3,65(s,3H), 3,64(s,3H), 3,44(t,1H,J=8,72Hz), 3,27(m,1H), 2,82(q,1H,J=6,78Hz).

¹³CRMN(150MHz,d6-DMSO) δ: 50,65(C-9), 55,33(C-31), 56,04(C-32), 56,09(C-8), 56,12(C-11), 62,50 C-29), 70,20(C-12), 71,38(C-34), 71,43(C-13), 75,03(C-33), 78,69(C-10), 79,04(C-30), 82,43(C-2), 88,07(C-21), 102,53(C-25), 110,52(C-6), 111,20(C-3), 112,47(C-5), 116,37(C-27), 118,58(C-4), 119,22(C-23), 132,29(C-17), 136,40(C-20), 147,60(C-36), 149,09(C-38), 150,35(C-28), 150,38(C-24).

Realización 21) Glicosilación

Se alimentan filigenina (372 mg, 0,001 mol) y tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-D-glucopiranosilo (1,11 g, 0,0015 mol) en un matraz de tres bocas de 100 ml, en el que la proporción molar de filigenina a tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-D-glucopiranosilo es 1:1,5, se agregan 20 ml de diclorometano anhidro y un tamiz molecular de aluminosilicato de tipo 3Å (744 mg), luego se introduce gas inerte argón para la protección del gas inerte, seguido de agitación durante 0,5 h, se agregan gota a gota 80 mg (0,312 mmol) de trifluorometanosulfonato de plata como catalizador ácido de Lewis, en el que la proporción molar de catalizador ácido de Lewis a tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-D-glucopiranosilo es 1:5, la proporción de masa del tamiz molecular a

filigenina es 2:1, la mezcla resultante se somete a glicosilación durante 8 h a 10 °C con agitación; el tamiz molecular se agrega con el fin de eliminar el agua resultante de la reacción para asegurar el resultado positivo de la reacción.

2) Tratamiento de inactivación

5 Se agrega tiosulfato de sodio como agente de inactivación (0,312 mmol) a la mezcla de reacción para inactivar la glicosilación, en la que la proporción molar de tiosulfato de sodio como agente de inactivación a trifluorometanosulfonato de trimetilsililo como catalizador ácido de Lewis es 1:1; luego, la mezcla de glicosilación inactivada se filtra usando un embudo Buchner, el filtrado se concentra y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = 2:1 (v/v)), para obtener tetrabenzoilfilirina;

3) Tratamiento de desacilación

10 3-1) Se disuelve tetra-benzoil-filirina en 30 ml de una mezcla de diclorometano y metanol, en la cual la proporción en volumen de diclorometano a metanol es 1:2, luego se agrega metóxido de sodio (0,22 mg, 0,004 mmol), en cuya la proporción molar de metóxido de sodio a tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-D-glucopiranosilo es 1:375, seguido de una reacción de desacilación durante 4 h con agitación, luego se agrega ácido acético como ajustador de pH para ajustar el valor de pH de la mezcla resultante de la reacción de desacilación a 7;

15 3-2) la mezcla resultante se concentra al vacío con un rotavapor para eliminar los disolventes por evaporación, seguido de purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: cloroformo/metanol = 8: 2 (v/v)), se obtienen 373,8 mg de filirina sólida de color blanco con un rendimiento total del 70%.

20 Las propiedades fisicoquímicas, los datos espectrales y los datos espectrométricos de masas del producto sólido de color blanco purificado son consistentes con los de la filirina descritos en los artículos de estudio, de este modo este compuesto se identifica como filirina.

Realización 3

1) Glicosilación

25 Se alimentan filigenina (372 mg, 0,001 mol) y tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosilo (1,23 g, 0,0025 mol) en un matraz de tres bocas de 100 ml, en la que la proporción molar de filigenina a tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosilo es 1:2,5, se agregan 20 ml de diclorometano anhidro y un tamiz molecular de aluminosilicato de tipo 5Å (744 mg), luego se introduce nitrógeno como gas inerte para la protección del gas inerte, seguido de agitación durante 0,5 h, se agrega gota a gota trimetilsiltriflato como catalizador ácido de Lewis (0,08 ml, 0,416 mmol), en el que la proporción molar del catalizador ácido de Lewis a tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosilo es 1: 6, la proporción de masa del tamiz molecular a la filigenina es 2:1, la mezcla resultante se somete a glicosilación durante 10 h a 0 °C con agitación;

2) Tratamiento de inactivación

35 Se agrega trietilamina como agente de inactivación (0,416 mmol) a la mezcla de reacción para inactivar la glicosilación, en la que la proporción molar de trietilamina como agente de inactivación a trifluorometanosulfonato de trimetilsililo como catalizador ácido de Lewis es 1:1; luego, la mezcla de glicosilación inactivada se filtra usando un embudo Buchner, el filtrado se concentra y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = 3: 2 (v/v)), para obtener tetra-acetil filirina;

3) Tratamiento de desacilación

40 3-1) Se disuelve tetra-acetil filirina en 30 ml de una mezcla de diclorometano y metanol, en la cual la proporción en volumen de diclorometano a metanol es 1:2, luego se agrega metóxido de sodio (0,337 mg, 0,00625 mmol), en el cual la proporción molar de metóxido de sodio a tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosilo es 1:400, seguido de una reacción de desacilación durante 4 h con agitación, luego se agrega ácido acético como ajustador de pH para ajustar el valor de pH de la mezcla resultante de la reacción de desacilación a 6;

45 3-2) la mezcla resultante se concentra al vacío con un rotavapor para eliminar los disolventes por evaporación, seguido de purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: cloroformo/metanol = 8: 2 (v/v)), para obtener 384,4 mg de filirina sólida de color blanco, con un rendimiento total del 72%.

Las propiedades fisicoquímicas, los datos espectrales y los datos espectrométricos de masas del producto sólido de color blanco purificado son consistentes con los de la filirina descritos en los artículos de estudio, de este modo este compuesto se identifica como filirina.

Realización 4

1) Glicosilación

5 Se alimentan filigenina (372 mg, 0,001 mol) y tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-glucopiranosilo (492,6 mg, 0,001 mol) en un matraz de tres bocas de 100 ml, en el que la proporción molar de filigenina a tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-glucopiranosilo es 1:1, se agregan al matraz 20 ml de diclorometano anhidro y un tamiz molecular de aluminosilicato de tipo 4Å (744 mg); luego se introduce nitrógeno como gas inerte para la protección del gas inerte, seguido de agitación durante 0,5 h, se agrega gota a gota un complejo de trifluoruro de boro-éter etílico como catalizador ácido de Lewis (0,025 ml, 0,2 mmol), en el que la proporción molar de catalizador ácido de Lewis a tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-glucopiranosilo es 1:5, la proporción de masa de tamiz molecular a filigenina es 2:1, la mezcla resultante se somete a glicosilación durante 10 h a 0 °C con agitación;

10 2) Tratamiento de inactivación

15 Se agrega trietilamina como agente de inactivación (0,2 mmol) a la mezcla de reacción para inactivar la glicosilación, en la que la proporción molar de trietilamina como agente de inactivación a eterato de trifluoruro de boro como catalizador de ácido de Lewis es 1:1; luego, la mezcla de glicosilación inactivada se filtra usando un embudo Buchner, el filtrado se concentra y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = 3: 2 (v/v)), para obtener tetra-acetil filirina;

3) Tratamiento de desacilación

20 3-1) Se disuelve tetra-acetil filirina en 30 ml de una mezcla de diclorometano y metanol, en la cual la proporción en volumen de diclorometano a metanol es 1:2, luego se agrega metóxido de sodio (0,11 mg, 0,002 mmol), en el cual la proporción molar de metóxido de sodio a tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosilo es 1:500, seguido de una reacción de desacilación durante 12 h con agitación, luego se agrega ácido acético como ajustador de pH para ajustar el valor de pH de la mezcla resultante de la reacción de desacilación a 7;

3-2) la mezcla resultante se concentra al vacío con un rotavapor para eliminar los disolventes por evaporación, seguido de purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: cloroformo/metanol = 8: 2 (v/v)), para obtener 400,5 mg de filirina sólida blanca, con un rendimiento total del 75%.

25 Las propiedades fisicoquímicas, los datos espectrales y los datos espectrométricos de masas del producto sólido de color blanco purificado son consistentes con los de la filirina descritos en los artículos de estudio, de este modo este compuesto se identifica como filirina.

Ejemplo de prueba: prueba antiviral de filirina

1 Prueba antiviral in vitro

30 1.1 Materiales de prueba

(1) Fármacos: los siguientes fármacos se disolvieron con agua purificada, se filtraron, esterilizaron, dividieron y almacenaron a 4 °C hasta su uso.

35 1) Filirina: sólido de color blanco, disponible de Dalian Fusheng Natural Drug Development Co.,Ltd. Pureza: 99,1%, determinada por HPLC equipada con detector UV y detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD) usando el procedimiento de normalización de área;

2) Inyección de ribavirina: un líquido transparente incoloro producido por Henan Runhong Pharmaceutical Co., Ltd., con número de lote: 1206261; Permiso médico nacional No.:H19993553; usado como fármaco de control positivo a 100 mg/ml en esta prueba;

40 3) Fosfato de oseltamivir, disponible de National Institute for Control of Pharmaceutical & Biological Products, con el número de lote 101096-200901;

usado como fármaco de control positivo a 100 mg/inyección en esta prueba.

(2) Cepa celular

La cepa de Células Vero (células de riñón de mono verde africano) se conserva en College of Basic Medical Sciences of Jilin University.

45 (3) Cepas de virus

1) El virus de la gripe, el virus de la parainfluenza y el virus respiratorio sincítico (RSV) estaban disponibles comercialmente en the Virus Institute of Chinese Preventive Medicine Academy of Science;

2) La cepa del virus Coxsackie B3 (CVB3) estaba disponible en EE. UU. y conservada por nuestra oficina de enseñanza e investigación;

3) La cepa del virus Coxsackie A16 (CoxA16) y la cepa del enterovirus EV71 fueron donadas por Sendai National Hospital en Japón y conservadas por nuestra oficina de enseñanza e investigación.

5 4) La cepa de adenovirus (AdV) estaba disponible en the Pediatric Research department of The First Hospital of Norman Bethune Medical University.

5) El virus del herpes simple de tipo I (HSV-1) se adquirió de T the Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Ministry of Health.

(4) Principales instrumentos y reactivos

Cabina de seguridad biológica	BHC-1300 II A/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

10

El DMSO estaba disponible en Tianjin Beilian Fine Chemicals Development Co., Ltd.

1.2 Procedimientos de prueba

(1) Preparación celular

15 Las células Vero se subcultivaron durante 1-2 días para formar una película. A continuación, los cultivos se sometieron a digestión con tripsina después de mostrar límites claramente observables y un fuerte sentido y dioptría tridimensionales. La digestión se drenó después de que se produjeran orificios en forma de aguja en la superficie celular, luego las células se dispersaron con unos pocos mililitros de medio, se contaron, luego se diluyeron hasta aproximadamente 5X10⁷ células/L con DMEM que contenía suero bovino fetal al 10% y se transfirieron a un placa de cultivo de 96 poros hasta que se forme una monocapa.

20 (2) Ensayo de toxicidad de fármacos

Prueba de citotoxicidad: los fármacos se diluyeron según las concentraciones que se muestran en la Tabla 1-1 para los ensayos de citotoxicidad.

Tabla 1-1 Tabla de referencia para diluir fármacos (unidad: g/l)

gradiente de concentración Fármaco	Gradiente 1	Gradiente 2	Gradiente 3	Gradiente 4	Gradiente 5	Gradiente 6	Gradiente 7	Gradiente 8
Filirina	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 osetamivir	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625

25 Se agregaron gota a gota diferentes concentraciones de fármacos diluidos con el medio de mantenimiento anterior (DMEM que contiene 2% de suero de ternero fetal) a las células de monocapa de Vero con 0,2 ml por poro, y para cada concentración, los fármacos se agregaron por sextuplicado en 6 poros respectivamente. Además, se

establecieron 6 poros como control normal (sin fármacos) mientras que otros 6 poros como control en blanco (solo medio). Las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C bajo 5% de CO₂. El CPE se visualizó bajo el microscopio invertido y se registró diariamente. Después de 72 h, se agregaron 20 µl de solución de MTT (5 mg · ml⁻¹) en cada poro y se incubó durante 4 h. El medio de cultivo de cada poro se aspiró y se desechó, se agregaron 100 µl de DMSO a cada poro. Luego, el cultivo se agitó durante 5 min, se midió el valor de OD a 492 nm para calcular la tasa de supervivencia celular. La tasa de supervivencia celular se analizó usando un modelo de regresión Probit en el software estadístico SPSS 18.0, y se calcularon la concentración máxima no tóxica (TC₀) y la concentración media tóxica (TC₅₀) de fármacos contra células Vero.

(3) Determinación de TCID₅₀ para cada virus

Se realizó una dilución en serie de 10 veces en cada virus para dar diluciones 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶. En cada uno de los poros sextuplicados de una placa de cultivo de 96 poros que contenía células Vero de monocapa se inocularon 100 µl de diluyente para cada dilución en secuencia mientras se configuraba el control de células normales. Las placas se incubaron durante 2 h a 37 °C en CO₂ al 5% seguido de la eliminación de la solución de virus, y se agregaron 100 µl de medio de mantenimiento celular a cada poro para una incubación adicional a 37 °C en CO₂ al 5%. El efecto citopático se examinó al microscopio a partir del tercer día, y los resultados se determinaron y registraron entre el séptimo y el octavo día. El título del virus se calculó por el procedimiento de Karber con un título de dilución máximo que permitió que ocurriera una citopatía positiva en el 50% de los poros celulares como punto final.

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

TCID₅₀: dosis de infección de histocitos al 50%

XM: logaritmo de la dilución de mayor concentración de virus

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

Se aspiró el medio de cultivo en placas cubiertas con células monocapa y se inocularon virus atacantes a una dosis de 100TCID₅₀ en las células para su posterior fijación en incubadora a 37 °C bajo 5% de CO₂ durante 2 h, y luego se agregaron de cierta concentración (concentración máxima no citotóxica más o menos) de cada fluido médico. Cada concentración se realizó por sextuplicado en 6 poros con 200 µl/poro. La inyección de ribavirina y el fosfato de oseltamivir sirvieron como grupos de control positivo, mientras que el grupo de control normal (sin virus ni fármaco) y el grupo de control de virus (agregando virus pero sin fármaco) se establecieron para examinar el efecto de los fármacos sobre el CPE inducido por virus. Después de 72 h, el valor de OD se mide por debajo de 492 nm de longitud de onda usando un procedimiento colorimétrico MTT, y se calculó la tasa eficaz antiviral (% ER) del fármaco. Se usó el procedimiento de análisis de varianza (ANOVA) en el software estadístico SPSS 18.0 para determinar si había una diferencia significativa entre los diferentes grupos de fármacos en la eficacia antiviral.

$$\% ER = \frac{\text{valor medio de OD del valor medio de OD de grupos tratados con el fármaco de grupos control del virus}}{\text{valor medio de OD del valor medio de OD de grupos control de células}} \times 100\%$$

1.3 Resultados

(1) TCID₅₀ para cada virus

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

Virus de la gripe:
$$\text{LogTCID}_{50} = -2 + 0,5 \cdot \frac{100 + 100 + 50}{100} = -4$$

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

HSV-1:
$$\text{LogTCID}_{50} = -2 + 0,5 \cdot \frac{100 + 100 + 100 + 30}{100} = -4,8$$

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

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

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

EV71:
$$\text{LogTCID}_{50} = -2 + 0,5 \cdot \frac{100 + 100 + 100 + 50}{100} = -5$$

(2) Determinación de la toxicidad del fármaco

1) Determinación de la citotoxicidad de los fármacos.

5 En la tabla 1-2 se muestran la concentración no citotóxica máxima (TC₀), la concentración tóxica media (TC₅₀) de cada fármaco contra las células Vero y las concentraciones de fármacos usados en el ensayo antivírico.

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

Virus \ Fármacos	Filirina	Ribavirina	Fosfato de oseltamivir
Concentración máxima no citotóxica	0,006	0,065	0,28
Concentración tóxica mediana	0,55	1,392	0,832
	0,30	0,01	0,70

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

Los resultados de las eficiencias antivirales de los fármacos y el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) se muestran en la tabla 1-3.

Tabla 1-3 Tabla estadística para la eficacia antiviral de los fármacos (% ER)

Fármacos Virus	Filirina	Ribavirina	Fosfato de oseltamivir
Virus de la gripe	75,38**	57,49**	81,76**
Virus de la parainfluenza	84,96**	91,56**	94,52**
CoxA16	75,08**	0,70	2,95
RSV	80,40**	50,08*	37,60
HSV-1	85,00**	62,92**	66,56**
ADV	75,14**	0,43	10,31
EV71	84,85**	4,25	51,86
CVB ₃	75,27**	13,44	1,64

Los resultados de la tabla 1-3 mostraron que los efectos inhibidores de la filirina sobre el virus de la gripe, el virus de la parainfluenza, el virus respiratorio sincítico (RSV), el virus coxsackie B3 (CVB3), el virus coxsackie A16 (CoxA16), el enterovirus EV71, el adenovirus (AdV) y el virus del herpes simple tipo I (HSV-1) fueron significativos; En los que, los efectos inhibidores sobre el virus de la gripe, el virus de la parainfluenza y el virus del herpes simple tipo I (HSV-1) fueron comparables a los efectos antivirales de los fármacos positivos tales como la ribavirina y el fosfato de oseltamivir (Tamiflu); y los efectos inhibidores sobre el virus coxsackie B3 (CVB3), el virus coxsackie A16 (CoxA16), el enterovirus EV71 y el adenovirus (AdV) fueron más notables que los de fármacos positivos tales como ribavirina y fosfato de oseltamivir (Tamiflu).

10 2. Prueba antiviral in vivo

2.1 Materiales experimentales

(1) Animales experimentales

Los ratones Kunming fueron proporcionados por Experimental Animal Center of Norman Bethune Health Science Center of Jilin University. Medicinal animal No. 10-5219

15 (2) Instrumentos experimentales

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 CO₂: HG303-5, Nanjing Experimental Instrument Factory;

20 Banco superlimpio: SW-CJ-IF, Suzhou Antai Air Tech Co., Ltd.;

Microscopio invertido: CKX41, Olympus Instrument;

Congelador de temperatura ultrabaja de -80 °C: TECON-5082, Australia;

Oscilador de baño de agua: HZS-H, Harbin Donglian Electronic technology Development Co., Ltd.;

Lector de microplacas: TECAN A-5082, Australia;

25 Espectrofotómetro: modelo 7550; Japón.

2.2 Procedimientos experimentales

(1) Estudio sobre el efecto de la filirina en la neumonía inducida la infección por el virus de la gripe y por el virus de la parainfluenza1) División de grupos y animales experimentales

5 Se adoptaron 140 ratones Kunming de cuatro semanas para realizar dos pruebas. Se adoptaron 140 ratones y se dividieron aleatoriamente en 14 grupos (n = 10 en cada grupo) para la determinación del índice pulmonar y la tasa inhibitoria del índice pulmonar después de la administración de filirina a ratones infectados con virus de la gripe y virus de la parainfluenza.

2) Procedimiento de infección

10 Se colocó un tapón de algodón absorbente en el vaso de precipitados (200 ~ 300 ml) y se vertió en el mismo una cantidad apropiada de éter etílico hasta que el algodón absorbente se humedeció. El vaso de precipitados provisto con el algodón absorbente se invirtió antes de colocar el ratón en él para anestesia. Después de que los ratones experimentaron una excitación extrema y una debilidad evidente, se colocaron en posición supina y se infectaron por vía nasal con el virus de la gripe 15LD50 y el virus de la parainfluenza a 0,03 ml/fosa nasal. En el grupo de control normal, la suspensión del virus se reemplazó con solución salina normal.

3) Procedimiento de administración y dosis de administración

15 A cada ratón se le administró por vía intragástrica filirina, ribavirina y fosfato de oseltamivir el día antes de la infección. La filirina se administró en una dosis alta de 13 mg/kg, en una dosis media de 6,5 mg/kg o en una dosis baja de 3,25 mg/kg, mientras que las dosis de los fármacos positivos ribavirina y fosfato de oseltamivir fueron 19,5 mg/kg y 58,5 mg./kg, respectivamente. La administración se puede realizar una vez al día durante cinco días consecutivos. El grupo de control del virus se empapó con solución salina normal del mismo volumen.

4) Determinación del índice pulmonar

25 En el quinto día después de que a los ratones administraron los fármacos, se impidió el acceso al agua y después de 8 h, los ratones se pesaron y luego se sacrificaron mediante exanguinación mediante enucleación ocular. Luego, los pulmones se extrajeron después de la apertura del tórax, se lavaron dos veces con solución salina normal seguido de la eliminación de la humedad de la superficie con un papel de filtro y se pesaron. El índice pulmonar y la tasa inhibitoria del índice pulmonar se calcularon según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Índice pulmonar} = \text{Peso de pulmón de ratón} / \text{Peso del cuerpo de ratón} \times 100\%$$

Índice de inhibición del índice pulmonar = ((índice pulmonar medio del grupo del modelo de infección - índice pulmonar medio del grupo experimental) / índice pulmonar medio del grupo modelo de infección) x 100%

2.3 Resultados experimentales y análisis

Después de que los ratones se infectaron con el virus de la gripe y el virus de la parainfluenza, los resultados medios del índice pulmonar mostraron que la filirina que varía desde 3,25 a 13,0 mg/kg/d proporcionó una protección sustancial al tejido pulmonar de los ratones bajo la infección del virus de la gripe y el virus de la parainfluenza, con los índices pulmonares de ambos significativamente reducidos. Los resultados se muestran en las tablas 2-1 y 2-2.

35 **Tabla 2-1 Índices pulmonares y tasas de inhibición del índice pulmonar de ratones a los que se les administró filirina después de la infección por el virus de la gripe (n = 3)**

Grupos	Dosis de fármacos (mg/kg/d)	Índice pulmonar ($\bar{X} \pm S$)	Tasa inhibitoria del índice de pulmonar (%)	Valor P
Grupo de control normal	0	1,277±0,105	-	
Grupo de control de virus	0	1,502±0,088	-	
Grupo de ribavirina	58,5	1,303±0,060	13,24	* <0,05

(continuación)

Grupos	Dosis de fármacos (mg/kg/d)	Índice pulmonar ($\bar{X} \pm S$)	Tasa inhibitoria del índice de pulmonar (%)	Valor P
Grupo de fosfato de oseltamivir	19,5	1,191±0,062	20,71	** <0,01
Grupo de dosis alta de filirina	13,0	1,290 ±0,041	14,51	** <0,01
Grupo de dosis media de filirina	6,5	1,307±0,068	12,97	* <0,05
Grupo de dosis baja de filirina	3,25	1,339±0,045	10,82	* <0,05

En comparación con el grupo de control de virus: * P <0,05, ** P <0,01.

Tabla 2-2 Índices pulmonares y tasas de inhibición del índice pulmonar de ratones a los que se les administró filirina después de la infección por el virus de la parainfluenza (n = 3)

Grupos	Dosis de fármacos (mg/kg/d)	Índice pulmonar ($\bar{X} \pm S$)	Tasa inhibitoria del índice de pulmonar (%)	Valor P
Grupo de control normal	0	1,316±0,031	-	
Grupo de control de virus	0	1,601±0,071	-	
Grupo de ribavirina	58,5	1.358±0,065	15,19	* <0,05
Grupo de fosfato de oseltamivir	19,5	1,256±0,057	21,56	* <0,05
Grupo de dosis alta de filirina	13,0	1,2297±0,071	19,01	* <0,05
Grupo de dosis media de filirina	6,5	1,327±0,064	17,11	* <0,05
Grupo de dosis baja de filirina	3,25	1,360±0,052	15,03	* <0,05

En comparación con el grupo de control de virus: * P <0,05, ** P <0,01.

5

2.4 Conclusión

Los resultados de la prueba antiviral in vivo mostraron que la dosis de filirina que varía desde 3,25 a 13,0 mg/kg/d tenía un efecto inhibitor significativo en la neumonía viral de ratones inducida por el virus de la gripe y el virus de la parainfluenza y podía reducir en gran medida ambos índices pulmonares y títulos de hemaglutinación, y representó una diferencia significativa en comparación con el grupo de control del virus.

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento químico para la síntesis de filirina, **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas:

5 1) disolver un receptor de glicosilo filigenina y un donante de glicosilo en un primer disolvente orgánico para glicosilación en presencia de un catalizador y un tamiz molecular bajo protección de un gas inerte para obtener tetraacil filirina, en el que el donante de glicosilo es tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acil-D-glucopiranosilo , el catalizador es un ácido de Lewis, el tamiz molecular es un tamiz molecular de aluminosilicato o polvo de aluminosilicato, y el primer disolvente orgánico es diclorometano, triclorometano, 1,2-diclorometano o tolueno;

10 2) disolver la tetraacil filirina en un segundo disolvente orgánico, agregar metóxido de sodio para desacilación, agregar un regulador de pH ácido para ajustar el valor de pH de la mezcla de reacción a neutro y realizar un tratamiento de purificación para obtener filirina, en el que el segundo disolvente orgánico es una solución mixta de diclorometano y metanol.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la proporción molar del catalizador respecto al donante de glicosilo tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acil-D-glucopiranosilo es 1:1-10.

15 3. El procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** también comprende una etapa 1A) de inactivación de la glicosilación con un agente de inactivación antes de que se disuelva la tetraacil filirina en el segundo disolvente orgánico.

4. El procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** en la etapa 2), la proporción molar de metóxido de sodio respecto al tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acil-D-glucopiranosilo es 1:300-500.

20 5. El procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la proporción en volumen de diclorometano respecto al metanol en la solución mixta de diclorometano y metanol es 1:1-10.