

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 839 090**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7048	(2006.01)	A61P 31/20	(2006.01)
A61K 31/34	(2006.01)	A61P 43/00	(2006.01)
A61P 31/16	(2006.01)		
A61P 31/22	(2006.01)		
A61K 47/40	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		
A61P 11/00	(2006.01)		
A61P 29/00	(2006.01)		
A61P 31/12	(2006.01)		
A61P 31/14	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2014 PCT/CN2014/094710**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16019684**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2014 E 14899145 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2020 EP 3178482**

54 Título: **Aplicaciones de la composición de filirina/filigenina en la preparación de fármacos o productos para el cuidado de la salud para aliviar y/o tratar enfermedades virales**

30 Prioridad:

07.08.2014 CN 201410389232

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LU, MINGMING;
FU, QIANG;
WANG, KAIQIAN;
HUI, MIN;
LIU, ZHENGXIAN;
LIU, YANG;
WANG, SHUO;
QU, HONGYING;
YU, XIAOJING;
WANG, HAILING y
GAI, XIN**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 839 090 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).

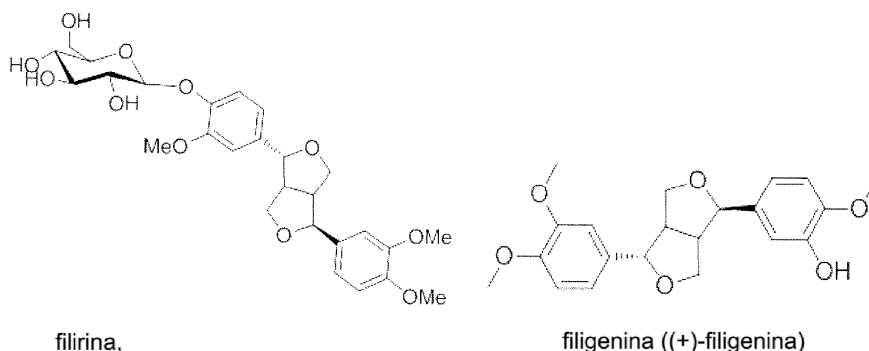
DESCRIPCIÓN

Aplicaciones de la composición de filirina/filigenina en la preparación de fármacos o productos para el cuidado de la salud para aliviar y/o tratar enfermedades virales

La presente invención pertenece al campo de la química farmacéutica y en particular se refiere a una composición de filirina/filigenina para el tratamiento de enfermedades virales.

La influenza es una de las enfermedades infecciosas respiratorias agudas y virales que son seriamente perjudiciales para la salud humana. Desde el siglo XXI, la prevalencia del SARS, el virus H5N1 y el virus de la influenza tipo A H1N1 traen grandes daños a los seres humanos. En la actualidad, todavía no existen fármacos naturales capaces de tratar eficazmente la influenza viral y la neumonía en el mundo.

Fructus Forsythiae son frutos secos de *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl (Oleáceas), que se cultiva principalmente en las provincias de Henan, Shanxi, Shanxi, Shandong y otros lugares de China, así como en las provincias de Hubei, Hebei, Sichuan y Gansu. *Forsythia* se usa comúnmente para tratar enfermedades de resfriado común agudo por viento-calor, carbunco y llagas, linfadenitis tuberculosa, infección del tracto urinario, etc. Los componentes principales de *Forsythia suspensa* incluyen filirina y filigenina aglicona (también conocida como filigenina), y la estructura de los dos componentes están representados por las siguientes fórmulas.



La filirina, como componente principal de *Forsythia suspensa*, tiene efectos antivirales, antibacterianos, antioxidantes, captadores de radicales libres y otros efectos farmacológicos. Filigenina, también conocida como un componente activo principal de *Forsythia suspensa*, tiene efectos antioxidantes, reductores de lípidos en sangre, captación de radicales libres, bacteriostasis, efectos antitumorales y antiinflamatorios. La literatura publicada se dirigió principalmente al estudio de los efectos farmacológicos antivirales de los extractos de *Forsythia suspensa* que contienen componentes desconocidos y varios componentes conocidos, y un solo componente de filirina. Sin embargo, aún no se estudiaron los efectos farmacológicos antivirales de la composición de filigenina/filirina y el componente único de filigenina.

El documento US6063383A divulga *Forsythia suspensa* y el extracto de la mismo, que describe en particular los muchos componentes activos presentes además de la filirina y la filigenina, por ejemplo, pinoresinol, forsitósido, rutina, suspensasida, salidroside y cornosida. Liang-hong Ye y col. (Eur J. Drug Metab. Ph., 38, 201-207) divulgan que la filigenina puede producirse mediante la desglicosilación de filirina por la flora intestinal. Los documentos CN1748776A y CN102210837A divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden filirina y muchos componentes activos. Estos documentos no divulgan la filigenina.

Para los problemas técnicos existentes en el tratamiento, prevención o alivio de enfermedades virales, un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición de filirina/filigenina para aliviar o/y tratar enfermedades virales. La composición de filirina/filigenina de la presente invención tiene un buen rendimiento y eficacia para aliviar o/y tratar enfermedades virales, y proporciona una nueva forma de desarrollar nuevos fármacos para aliviar o/y tratar enfermedades virales, es decir, proporcionar un nuevo enfoque para los fármacos o alimentos saludables para aliviar, acondicionar y tratar enfermedades virales.

Para lograr el objetivo anterior, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el alivio y/o tratamiento de una enfermedad viral, en la que la composición farmacéutica consiste en filirina, filigenina y un vehículo farmacéuticamente aceptable y la proporción de en filirina a filigenina en partes en peso es 80-98: 2-20.

Preferiblemente, las enfermedades virales son aquellas causadas por un virus seleccionado del grupo que consiste en virus de la influenza, virus de la parainfluenza, virus Cocksackie CoxA16, virus respiratorios sincitiales (VSR), virus del herpes zoster simple HSV-I, virus del herpes zoster simple HSV-II, virus del herpes zoster simple CVB3, adenovirus ADV o enterovirus EV71, particularmente enfermedades causadas por influenza viral, neumonía y enfermedades

infecciosas respiratorias causadas por virus de la influenza, virus de la parainfluenza, virus Coxsackie CoxA16 y virus sincitial respiratorio (VSR).

En el proceso de cribado de componentes activos naturales que son efectivos para aliviar o/y tratar la influenza viral, la neumonía y las enfermedades infecciosas respiratorias, el inventor encontró que la composición de filirina/filigenina tiene un efecto poderoso sobre la inhibición de la influenza viral y la neumonía con una eficacia notablemente mejor que la filirina o la filigenina empleadas solas.

Preferiblemente, la relación en peso de filirina a filigenina en la composición de filirina/filigenina es 90-98: 2-10, o más preferiblemente 98: 2.

Los profesionales sanitarios generalmente consideran que un vehículo farmacéuticamente aceptable puede lograr este propósito y servir como un componente no activo de los fármacos. La compilación de los vehículos farmacéuticamente aceptables se puede encontrar en libros de referencia, tales como Handbook of Pharmaceutical excipients, 2a Edition, editado por A. Wade y P. J. Weller, publicado por American Pharmaceutical Association, Washington y la Pharmaceutical Press, Londres, 1994.

El vehículo puede incluir un excipiente, tal como almidón y agua; un lubricante, tal como estearato de magnesio; un desintegrante, tal como celulosa microcristalina; un relleno, tal como lactosa; un aglutinante, tal como almidón pregelatinizado y dextrina; un edulcorante; un antioxidante; un antiséptico, un saborizante, una esencia, etc.

El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser ciclodextrina, preferiblemente α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina.

La composición farmacéutica de la presente invención puede existir en una forma seleccionada de un grupo que consiste en un comprimido, una cápsula, una píldora, un polvo, gránulos, un jarabe, una solución, una emulsión, una inyección, un aerosol, un atomizador, un gel, una crema, una cataplasma, un emplastro de goma o un parche.

La relación en peso de la filirina y la filigenina en la composición de filirina/filigenina al vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser de 1: 1 a 1: 100, preferiblemente 1: 100, más preferiblemente 1: 5, aún más preferiblemente 1: 2, e incluso aún más preferiblemente 1: 1.

Específicamente, el contenido de la composición de filirina/filigenina es igual o superior al 80% (es decir, $> 80\%$), preferiblemente $\geq 85\%$, más preferiblemente $\geq 88\%$, aún más preferiblemente $\geq 90\%$, e incluso aún más preferiblemente $\geq 99\%$.

La composición de filirina/filigenina puede estar formada por filirina y filigenina en forma de monómeros, o puede ser una composición de extracto de filigenina-filirina preparada mediante extracción con calor usando un disolvente, o puede ser una composición de filigenina-filirina-ciclodextrina formada combinando filigenina y filirina con ciclodextrina o un derivado de ciclodextrina.

La composición de filigenina-filirina-ciclodextrina puede ser una mezcla formada por la mezcla de filigenina y filirina con α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina o un derivado de las mismas, o un compuesto formado por filigenina, filirina y α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina o un derivado de las mismas mediante tratamiento físico o químico.

La relación entre el peso total de filirina y filigenina en la composición de filigenina-filirina-ciclodextrina al peso de la ciclodextrina o derivado de ciclodextrina puede ser 1: 1-50.

Particularmente, la ciclodextrina es α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina; el derivado de ciclodextrina es hidroxietil β -ciclodextrina, 2,6-dimetil β -ciclodextrina, 2,3,6-trimetil β -ciclodextrina, 2,6-dietil β -ciclodextrina, 2,3,6-dietil β -ciclodextrina, maltosil β -ciclodextrina o sulfobutil éter β -ciclodextrina, β -ciclodextrina sustituida con cloruro de p-toluenosulfonilo (p-TsCl), p-toluenosulfonato de β -CD sustituida en posición 6 (β -ciclodextrina-6-OTs), 2-oxihidroxipropil- β -ciclodextrina, p-toluenosulfonato monosustituido en posición 2 (β -ciclodextrina-2-OTs), p-toluenosulfonato de β -ciclodextrina (Tosil- β -CD) y una macromolécula en forma de estrella de β -ciclodextrina PCL-(Tos) 7- β -CD.

La composición de filirina/filigenina se puede preparar de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- 1) extracción a reflujo de hojas o frutos de Forsythia suspensa usando un solvente bajo calentamiento durante 2 a 3 veces, de 2 a 4 horas cada vez;
- 2) concentración del líquido extraído y luego dejar reposar el concentrado para que se precipite, obteniendo así una mezcla cruda de filigenina y filirina;
- 3) disolución de la mezcla bruta de filigenina y filirina en un disolvente, dejando reposar la misma para la cristalización, para obtener una mezcla de filigenina y filirina;

4) someter la mezcla de filigenina y filirina a recristalización utilizando un disolvente, para obtener un extracto de filigenina-filirina.

5 El disolvente en las etapas 1), 3) y 4) puede ser metanol, etanol, acetona, una solución de metanol que comprende agua o una solución de etanol que comprende agua.

La concentración porcentual en masa de la solución de metanol puede ser del 70 al 95%; la concentración porcentual en masa de la solución de etanol puede ser del 70 al 95%.

10 En la etapa 2), el reposo para la operación de precipitación se puede llevar a cabo a temperatura ambiente, preferiblemente de 10 a 35 °C, más preferiblemente de 20 a 25 °C; el tiempo de reposo puede ser de 1 a 48 horas; en la etapa 2), la relación entre el volumen del líquido de extracción concentrado y el volumen del líquido de extracción original puede ser de 0,1 a 0,5: 1.

15 En la etapa 4), la recristalización se lleva a cabo a temperatura ambiente, preferiblemente de 10 a 35 °C, más preferiblemente de 20 a 25 °C.

20 A menos que se indique lo contrario, el término "dosis terapéuticamente eficaz" utilizado en este documento es la dosis del fármaco deseada para producir la eficacia; la "dosis terapéuticamente efectiva" puede ser ajustada y variada, finalmente determinada por el personal médico, dependiendo de los factores considerados, incluyendo la vía de administración, la propiedad de la preparación, el peso del receptor, la edad y otras condiciones generales, y la naturaleza y gravedad de las enfermedades a tratar.

En comparación con la técnica anterior, la presente invención tiene las siguientes ventajas distintas:

25 El procedimiento de preparación de la composición de filirina/filigenina de la presente invención es simple y adecuado para la producción industrial, la composición tiene una eficacia notable sobre la resistencia a diversas enfermedades virales como la influenza y la neumonía, y la eficacia antiviral es mejor que la de la filirina y la filigenina usadas solas, y también mejor que el fosfato de oseltamivir (Tamiflu), que es el último fármaco antiviral en las clínicas. Además, también se ha encontrado que la composición de filirina/filigenina tiene eficacia sobre la resistencia a otros virus, exhibe un efecto inhibidor significativo sobre el virus Cocksackie CoxA16, virus respiratorios sincitiales (VSR), virus del herpes zoster simple HSV-I, virus del herpes zoster simple HSV-II, virus del herpes zóster simple CVB3, adenovirus ADV y enterovirus EV71, y se puede utilizar para el tratamiento de enfermedades causadas por los virus antes mencionados, tales como influenza y neumonía, herpes zoster, miocarditis, enfermedad de manos, pies y boca, infección del tracto respiratorio superior, bronquitis capilar, erupciones cutáneas y meningitis. Por lo tanto, la composición de la presente invención puede usarse para aliviar o/y tratar enfermedades tales como influenza viral y neumonía, herpes zoster, miocarditis, enfermedad de manos, pies y boca, infección del tracto respiratorio superior, bronquitis capilar, erupciones cutáneas, meningitis y otras enfermedades, abriendo así un nuevo campo para el uso de material medicinal con Forsythia suspensa.

40 1. La composición de filirina/filigenina de la presente invención tiene eficacia sobre la resistencia a los virus de la influenza y los virus de la neumonía, y la eficacia es significativamente mejor que la de la filirina y la filigenina utilizadas solas; la filirina y la filigenina se utilizan en combinación en una proporción especificada para producir un efecto sinérgico;

45 2. La composición de filirina/filigenina de la presente invención tiene un efecto inhibidor sobre el virus Cocksackie CoxA16, virus respiratorios sincitiales (VSR), virus del herpes zoster simple HSV-I, virus del herpes zoster simple HSV-II, virus del herpes zoster simple CVB3, adenovirus ADV, enterovirus EV71 y otros virus; la composición de filirina/filigenina se puede usar para el tratamiento de enfermedades causadas por los virus mencionados anteriormente, tales como influenza y neumonía, herpes zoster, miocarditis, enfermedad de manos, pies y boca, infección del tracto respiratorio superior, bronquitis capilar, erupciones cutáneas, y meningitis;

50 3. La composición de filirina/filigenina de la presente invención tiene efectos significativos sobre la inhibición de las inflamaciones causadas por virus y la mejora de la inmunidad del paciente; la composición de filirina/filigenina tiene un efecto farmacológico notable sobre la inhibición de la influenza viral y la neumonía, es muy eficaz en el alivio, acondicionamiento y tratamiento de la influenza viral y la neumonía, tiene una acción rápida, menos tóxicos o efectos secundarios y buena seguridad, es adecuada para administración a largo plazo y tiene buenas perspectivas medicinales;

55 4. La materia prima de la composición farmacéutica de la invención preventiva es abundante, de bajo precio y segura para la aplicación clínica, el proceso de preparación es simple. La composición farmacéutica puede tomar varias formas y la dosis puede ser pequeña, fácil de usar y, por tanto, fácil de promover;

60 5. La composición de filirina/filigenina de la presente invención se puede preparar a partir de componentes monoméricos en combinación cuantitativa, también se puede preparar extrayendo Fructus Forsythiae, o un compuesto de la composición de filirina/filigenina y α -ciclodextrina o β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina, o un derivado de ciclodextrina, y puede ser además un compuesto de la composición de filirina/filigenina y otros

componentes activos (tales como uno o más de los extractos de *Herba taraxaci*, extracto de *Radix isatidis*, extracto de *Flos Ionicera*, extracto de *Rhizoma anemarrhena*, extracto de *Radix scrophularia*, Extracto de *Spica prunella*, extracto de *Rhizoma phragmites* y extracto de *Herba lophatheri*, extracto de *Fructus gardeniae*, extracto de *Bulbus fritillariae cirrhosae*, extracto de hoja de acebo chino y extracto de *Herba houttuyniae*), preparando así una medicina compuesta para el tratamiento de la influenza viral, neumonía y otras enfermedades virales.

Ejemplos 1-4 Preparación de composiciones de filirina/filigenina

Se pesaron por separado polvos de dos componentes monoméricos, es decir, filirina y filigenina, para mezclarlos de acuerdo con la relación en peso que se muestra en la Tabla 1, para preparar una composición de filirina/filigenina; el monómero de filirina fue fabricado por Dalian Fusheng Natural Drug Development Co., Ltd.; se determinó que su pureza era del 99,5%, determinada por HPLC equipado con detector UV y detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD) usando el procedimiento de normalización de área, y su contenido se calibró y confirmó que era del 99,5% con el estándar de filirina disponible a través de China Pharmaceutical and Biological Products para determinación del contenido; la filigenina fue fabricada por Dalian Fusheng Natural Drug Development Co., Ltd., la pureza de la misma se determinó en 99,1%, determinada por HPLC equipado con detector UV y detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD) usando el procedimiento de normalización de área.

Tabla 1. Tabla de relación de materias primas para las composiciones de filirina/filigenina de los Ejemplos 1-4

Ejemplo No.	relación en peso	
	filirina	filigenina
Ejemplo 1	98	2
Ejemplo 2	80	20
Ejemplo 3	90	10
Ejemplo 4	95	5

Ejemplos 5-24 Preparación de la composición farmacéutica de filirina/filigenina

Se tomó la composición de filirina/filigenina preparada en el Ejemplo 1-4 para prepararla en una composición que comprende ciclodextrina de acuerdo con la relación en peso mostrada en la Tabla 2 usando el siguiente procedimiento: (1) agregar directamente a una solución de ciclodextrina, o (2) agregar directamente a una solución de ciclodextrina y agitar bien durante 1-24 h, (3) agregar directamente a una solución de ciclodextrina y calentar durante 10-120 min, (4) agregar directamente a una solución de ciclodextrina y realizar un tratamiento ultrasónico durante 120 min, (5) triturar directamente junto con ciclodextrina en polvo durante 10-120 min, (6) mezclar bien la composición de filirina/filigenina con ciclodextrina en polvo y tamizar la mezcla; (7) agregar directamente a una solución de derivado de ciclodextrina, u (8) agregar directamente a una solución de derivado de ciclodextrina y agitar bien durante 1-24 h, (9) agregar directamente a una solución de derivado de ciclodextrina y calentar durante 10-120 min, (10) agregar directamente a una solución de derivado de ciclodextrina y realizar un tratamiento ultrasónico durante 10-120 min, (11) triturar directamente junto con polvo derivado de ciclodextrina durante 10-120 min, (12) mezclar bien con polvo derivado de ciclodextrina y tamizar la mezcla.

Tabla 2. Relación de materia prima y procedimiento de preparación de los Ejemplos 5-24

Ejemplo No.	composición de filirina/filigenina (g)	ciclodextrina o derivados de ciclodextrina (g)	procedimiento de preparación
Ejemplo 5	100 (98:2)	100	(1) agregar directamente una solución de ciclodextrina
Ejemplo 6	100 (80:20)	10000	(2) agitación durante 1 h
Ejemplo 7	100 (90:10)	500	(5) calentamiento durante 10 min
Ejemplo 8	100 (95:5)	1000	(4) tratamiento ultrasónico durante 10 min
Ejemplo 9	100 (98:2)	2000	(5) tritución con ciclodextrina en polvo durante 10 min
Ejemplo 10	100 (98:2)	3000	(6) mezclar bien con la ciclodextrina en polvo y tamizar durante 10 min
Ejemplo 11	100 (98:2)	4000	(1) agregar directamente a una solución de ciclodextrina
Ejemplo 12	100 (98:2)	3500	(2) agitación durante 12 h

(continuación)

Ejemplo No.	composición de filirina/filigenina (g)	ciclodextrina o derivados de ciclodextrina (g)	procedimiento de preparación
Ejemplo 13	100(98:2)	4500	(3) calentamiento durante 120 min
Ejemplo 14	100 (98:2)	1500	(4) tratamiento ultrasónico durante 120 min
Ejemplo 15	100 (98:2)	100	(7) agregar directamente una solución de derivado de ciclodextrina
Ejemplo 16	100 (80:20)	10000	(8) agitación durante 1 h
Ejemplo 17	100 (90:10)	500	(9) calentamiento durante 10 min
Ejemplo 18	100 (95:5)	1000	(10) tratamiento ultrasónico durante 10 min
Ejemplo 19	100 (98:2)	2000	(11) trituración con derivado de ciclodextrina durante 10 min
Ejemplo 20	100 (98:2)	3000	(12) mezclar bien con derivado de ciclodextrina y tamizar durante 10 min
Ejemplo 21	100 (98:2)	4000	(1) agregar directamente
Ejemplo 22	100 (98:2)	3500	(2) agitación durante 12 h
Ejemplo 23	100 (98:2)	4500	(5) calentamiento durante 120 min
Ejemplo 24	100 (98:2)	1500	(6) tratamiento ultrasónico durante 120 min

Los Ejemplos 5-24 usan β -ciclodextrina como excipiente, sin embargo, otras ciclodextrinas y derivados de ciclodextrina también son aplicables a la presente invención, tales como 1) β -hidroxietil ciclodextrina, 2) hidroetil β -ciclodextrina, 3) 2,6-dimetil β -ciclodextrina, 4) 2,3,6-trimetil β -ciclodextrina, 5) 2,6-dietil β -ciclodextrina, 6) 2,3,6-trietil β -ciclodextrina, 7) maltosil β -ciclodextrina, 8) sulfobutil éter β -ciclodextrina, 9) β -ciclodextrina sustituida con cloruro de p-toluenosulfonilo (p-TsCl), 10) p-toluenosulfonato de β -CD sustituido en posición 6 (β -ciclodextrina-6-OTs), 11) 2-oxi-hidroxipropil- β -ciclodextrina, 12) p-toluenosulfonato monosustituido en posición 2 (β -ciclodextrina-2-OTs), 13) p-toluenosulfonato de β -ciclodextrina (Tosil-p-CD), y 15) una macromolécula con forma de estrella de β -ciclodextrina PCL-(Tos) 7- β -CD.

5 Ejemplo 25. Preparación de la composición de filirina y filigenina

Se añadieron 10 kg de etanol al 95% (n/m) a 1 kg de hojas secas de Forsythia suspensa, la mezcla se extrajo a reflujo con calentamiento dos veces durante 2 h cada vez, el líquido extraído se filtró, el filtrado se concentró al vacío hasta la mitad del volumen original y se dejó reposar a 25 °C durante 1 h para separar los precipitados; los precipitados se disolvieron con metanol para la recrystalización y los precipitados se separaron; se repitió el proceso anterior para la recrystalización con metanol para obtener un polvo amorfo de una composición de filirina/filigenina, siendo los contenidos de filirina y filigenina 98% y 2% respectivamente, según lo determinado por HPLC.

20 Ejemplo 26. Preparación de la composición de filirina y filigenina

Se agregaron 10 kg de metanol a 1 kg de frutos secos de Forsythia suspensa, la mezcla se extrajo a reflujo con calentamiento tres veces durante 4 h cada vez, el líquido extraído se filtró, el filtrado se concentró al vacío a 1/10 del volumen original y se dejó reposar a 20 °C durante 48 h para separar los precipitados; los precipitados se disolvieron con etanol para la recrystalización y los precipitados se separaron; se repitió el proceso anterior para la recrystalización con etanol para obtener un polvo amorfo de una composición de filirina/filigenina, siendo los contenidos de filirina y filigenina 95% y 4% respectivamente.

30 Ejemplo 27. Preparación de la composición de filirina y filigenina

Se añadieron 10 kg de metanol al 70% (m/m) a 1 kg de hojas secas de Forsythia suspensa, la mezcla se extrajo a reflujo con calentamiento 3 veces durante 3 h cada vez; el líquido extraído se filtró, el filtrado se concentró al vacío hasta 1/3 del volumen original y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 h para separar los precipitados; los precipitados se disolvieron con metanol al 90% para su recrystalización y los precipitados se separaron; se repitió el proceso anterior para la recrystalización con metanol para obtener un polvo amorfo de una composición de filirina/filigenina, siendo los contenidos de filirina y filigenina 88% y 2% respectivamente.

35 Ejemplo 28. Preparación de la composición de filirina y filigenina

Se añadieron 10 kg de etanol anhidro a 1 kg de frutos secos de *Forsythia suspensa*, la mezcla se extrajo a reflujo calentando dos veces durante 4 h cada vez; el líquido extraído se filtró, el filtrado se concentró al vacío hasta 1/4 del volumen original y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 h para separar los precipitados; los precipitados se disolvieron con acetona para la recrystalización y los precipitados se separaron; se repitió el proceso anterior para la recrystalización con acetona para obtener un polvo amorfo de la composición de filirina/filigenina, siendo los contenidos de filirina y filigenina 90% y 6% respectivamente.

Ejemplo 29. Preparación de la composición de filirina y filigenina

Se añadieron 10 kg de acetona a 1 kg de hojas secas de *Forsythia suspensa*; la mezcla se extrajo a reflujo tres veces durante 3 h cada vez; el líquido extraído se filtró, el filtrado se concentró al vacío hasta 1/5 del volumen original y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 h para separar los precipitados; los precipitados se disolvieron con etanol al 70% para la recrystalización y los precipitados se separaron; se repitió el proceso anterior para la recrystalización con etanol al 70% para obtener un polvo amorfo de una composición de filirina/filigenina, siendo los contenidos de filirina y filigenina 80% y 5% respectivamente.

Ejemplo 30. Preparación de comprimidos de la composición de filirina y filigenina

Los comprimidos de la composición de filirina/filigenina se prepararon de acuerdo con la siguiente relación de masa:

composición de filirina/filigenina (la relación en peso de la misma fue 98:2)	500 g
almidón	480 g
talco en polvo	1% (10 g)
estearato de magnesio	1% (10 g)

De acuerdo con la relación anterior, la composición de filirina/filigenina preparada en el Ejemplo 1 se mezcló bien con almidón y luego la mezcla se preparó en gránulos; se añadieron talco y estearato de magnesio y se mezclaron bien, y la mezcla se comprimió en 10.000 comprimidos.

Ejemplo 31. Preparación de los gránulos de la composición de filirina/filigenina

Los gránulos de la composición de filirina/filigenina se prepararon de acuerdo con la siguiente relación de masa:

composición de filirina/filigenina (la relación en peso de la misma fue 98:2)	100 g
celulosa microcristalina	10.000 g

De acuerdo con la relación anterior, la composición de filirina/filigenina preparada en el Ejemplo 1 se mezcló bien con celulosa microcristalina y luego la mezcla se preparó en gránulos; los gránulos se embolsaron para formar 10.000 bolsas.

Ejemplo 32. Preparación de las cápsulas de la composición de filirina/filigenina

Las cápsulas de la composición de filirina/filigenina se prepararon de acuerdo con la siguiente relación de masa:

composición de filirina/filigenina (la relación en peso de la misma fue 98:2)	250 g
almidón	2.500 g

De acuerdo con la relación anterior, la composición de filirina/filigenina preparada en el Ejemplo 1 se mezcló bien con almidón y luego la mezcla se preparó en cápsulas para formar 10.000 cápsulas.

Ejemplos 33-36. Preparación de las cápsulas de la composición de filirina/filigenina

En los Ejemplos 33-36, las composiciones de filirina/filigenina se mezclaron bien con almidón de acuerdo con la relación en peso mostrada en la Tabla 3, y luego se preparó la mezcla en cápsulas para formar 10.000 cápsulas para cada ejemplo.

Tabla 3

Ejemplo No.	Materia prima (composición de filigenina y filirina, g)	Adyuvante farmacéutico (almidón, g)	Relación en peso de la materia prima con respecto al adyuvante farmacéutico
Ejemplo 33	500 (98:2)	500	1:1
Ejemplo 34	50 (80:20)	5.000	1:100
Ejemplo 35	250 (90:10)	2.500	1:10
Ejemplo 36	250 (95: 5)	5.000	1:20

Los materiales de la tabla se pueden reemplazar con la composición de filigenina y filirina preparada en los Ejemplo 5-29.

Ejemplos 37-40. Preparación de los gránulos de la composición de filirina/filigenina

En los Ejemplo 37-30, la composición de filirina/filigenina se mezcló bien con celulosa microcristalina de acuerdo con las relaciones en peso mostradas en la Tabla 4 respectivamente, y luego la mezcla se preparó en gránulos, los gránulos se embolsaron para formar 10.000 bolsas.

Tabla 4

Ejemplo No.	Materia prima (composición de filigenina y filirina, g)	Adyuvante farmacéutico (celulosa microcristalina, g)	Relación en peso de la materia prima con respecto al adyuvante farmacéutico
Ejemplo 37	1.000 (98:2)	1.000	1:1
Ejemplo 38	250 (80:20)	25.000	1:100
Ejemplo 39	2.500 (90:10)	25.000	1:10
Ejemplo 30	2.500 (95:5)	50.000	1:20

Las materias primas de la tabla se pueden reemplazar con la composición de filigenina y filirina preparada en los Ejemplo 5-29.

Ejemplo 41. Preparación de comprimidos de la composición de filirina/filigenina

Los comprimidos de la composición de filirina/filigenina se prepararon de acuerdo con la siguiente relación de masa:

composición de filirina/filigenina (la relación en peso de la misma fue 98:2)	500 g
almidón	380 g
extracto de Diente de león	100 g
talco en polvo	1% (10g)
estearato de magnesio	1% (10 g)

De acuerdo con la relación anterior, la composición de filirina/filigenina se mezcló bien con el extracto en polvo anterior y luego, una vez que se mezcló bien con almidón, la mezcla se preparó en gránulos, se agregaron talco en polvo y estearato de magnesio y se mezclaron bien, y luego, la mezcla se comprimió en 10.000 comprimidos. En los que, la composición de filirina/filigenina en el presente ejemplo se puede reemplazar con la composición de filirina y filigenina preparada en los Ejemplos 5-29.

Ejemplo 42. Preparación de los gránulos de la composición de filirina/filigenina

Los gránulos de la composición de filirina/filigenina se prepararon de acuerdo con la siguiente relación de masa:

composición de filirina/filigenina (la relación en peso de la misma fue 98:2)	250 g
extracto de Radix isatidis	250 g
extracto de Flos Ionicera	250 g
celulosa microcristalina	24.500 g

De acuerdo con la relación anterior, la composición de filirina/filigenina se mezcló bien con el extracto en polvo anterior, y luego se mezcló bien con celulosa microcristalina, la mezcla se preparó en gránulos; los gránulos se embolsaron para formar 10.000 bolsas. En las que, la composición de filirina/filigenina en el presente ejemplo se puede reemplazar con la composición de filirina y filigenina preparada en los Ejemplo 5-29.

Ejemplo 43. Preparación de las cápsulas de la composición de filirina/filigenina

Los gránulos de la composición de filirina/filigenina se prepararon de acuerdo con la siguiente relación de masa:

composición de filirina/filigenina (la relación en peso de la misma fue 98:2)	250 g
extracto de Fructus gardeniae	250 g
extracto de Bulbus fritillariae cirrhosae	250 g
extracto de hoja de Acebo chino	250 g
almidón	1.000 g

De acuerdo con la relación anterior, la composición de filirina/filigenina se mezcló bien con el extracto en polvo anterior, y luego se mezcló bien con almidón y la mezcla se preparó en cápsulas para formar 10.000 cápsulas. En las que, la composición de filirina/filigenina en el presente ejemplo se puede reemplazar con la composición de filirina y filigenina preparada en los Ejemplos 5-29.

Ejemplo 52. Preparación de comprimidos de la composición de filirina/filigenina

Los comprimidos de la composición de filirina/filigenina se prepararon de acuerdo con la siguiente relación de masa:

5	composición de filirina/filigenina (la relación en peso de la misma fue 80:20)	500 g
	almidón	480 g
	extracto de Rizoma anemarrhena	500 g
	talco en polvo	1% (10 g)
	estearato de magnesio	1% (10 g)

De acuerdo con la relación anterior, la composición de filirina/filigenina se mezcló bien con el extracto en polvo anterior y luego se mezcló bien con almidón, la mezcla se preparó en gránulos; se añadieron talco y estearato de magnesio y se mezclaron bien; la mezcla se comprimó en 10.000 comprimidos. En los que, la composición de filirina/filigenina en el presente ejemplo se puede reemplazar con la composición de filirina y filigenina preparada en los Ejemplo 5-29.

Ejemplo 53. Preparación de los gránulos de la composición de filirina/filigenina

Los gránulos de la composición de filirina/filigenina se prepararon de acuerdo con la siguiente relación de masa:

20	composición de filirina/filigenina (la relación en peso de la misma fue 90:10)	1.000 g
	extracto de Radix scrophularia	500 g
	extracto de Herba lophatheri	500 g
	celulosa microcristalina	10.000 g

De acuerdo con la relación anterior, la composición de filirina/filigenina se mezcló bien con el extracto en polvo anterior, y luego se mezcló bien con celulosa microcristalina, y la mezcla se preparó en gránulos; los gránulos se embolsaron para formar 10.000 bolsas. En las que, la composición de filirina/filigenina en el presente ejemplo se puede reemplazar con la composición de filirina y filigenina preparada en los Ejemplo 5-29.

Ejemplo 54. Preparación de las cápsulas de la composición de filirina/filigenina

Las cápsulas de la composición de filirina/filigenina se prepararon de acuerdo con la siguiente relación en masa:

35	composición de filirina/filigenina (la relación en peso de la misma fue 94:6)	2.000 g
	extracto de Spica prunella	250 g
	extracto de Herba houttuyniae	500 g
	extracto de Rizoma phragmites	250 g
	almidón	1.000 g

De acuerdo con la relación anterior, la composición de filirina/filigenina se mezcló bien con el extracto en polvo anterior y luego se mezcló bien con almidón y la mezcla se preparó en cápsulas para formar 10.000 cápsulas. En las que, la composición de filirina/filigenina en el presente ejemplo se puede reemplazar con la composición de filirina y filigenina preparada en los Ejemplo 5-29.

Ejemplo de prueba 1. Prueba antiviral de la composición de formitina/filigenina**1. Prueba antiviral *in vitro*****1.1 Materiales de prueba****(1) Fármacos**

① Filirina, polvo blanco, producido por Dalian Fusheng Natural Drug Development Co. Ltd., se determinó que la pureza de la misma era del 99,5%, determinada por HPLC equipado con detector UV y detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD) usando el procedimiento de normalización de área, y el contenido del mismo se calibró y se confirmó que era del 99,5% con el estándar de filirina disponible a través de China Pharmaceutical and Biological Products para la determinación del contenido.

② Filigenina, polvo blanco y producido por Dalian Fusheng Natural Drug Development Co. Ltd., la pureza de la misma se determinó en 99,1%, determinada por HPLC equipado con detector UV y detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD) usando el procedimiento de normalización de área, y el contenido del mismo se calibró y se confirmó que era del 99,1% con el estándar de filirina disponible en China Pharmaceutical and Biological Products para la determinación del contenido.

③ La composición A de filirina/filigenina, que era un polvo blanco y producida por Dalian Fusheng Natural Drug Development Co. Ltd., estaba formada por dos monómeros de filirina y filigenina en una proporción; calibrando usando 99,5% de filirina y 99,1% de filigenina como control, el contenido de cada uno de los

monómeros en la composición de filirina/filigenina fue del 98%; en la que la relación en peso de forsitina a filigenol en la composición A de forsitina/filigenol era 98:2; composición B de filirina/filigenina: que era un polvo blanco y producido por Dalian Fusheng Natural Drug Development Co. Ltd., estaba formada por dos monómeros de filirina y filigenina; la relación en peso de filirina a filigenina en la composición A de filirina/filigenina fue de 80:20.

④ Inyección de ribavirina, un líquido transparente e incoloro, producido por He'nan Runhong Pharmaceutical Co. Ltd., número de lote: 1206261, permiso médico nacional No: H19993553, 100 mg/ml, adoptado como fármaco de control positivo para la presente prueba.

⑤ Fosfato de oseltamivir, disponible a través del Instituto Nacional para el Control de Productos Farmacéuticos y Biológicos, con número de lote: 101096-200901, 100 mg/inyección, adoptado como fármaco de control positivo para la presente prueba. Los fármacos mencionados anteriormente se disolvieron todos con agua purificada, se filtraron, se esterilizaron, se subempacaron y se almacenaron a 4 °C para su uso posterior; todos ellos eran fármacos que se probarían en la presente prueba.

(2) Cepa celular:

la cepa celular de Vero (células renales de mono verde africano) fue preservada por la Facultad de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad de Jilin.

(3) Cepas de virus:

① cepas del virus de la influenza, cepas del virus de la parainfluenza, cepas del virus sincitial respiratorio (VSR): adquiridas a través del Instituto de Virus de la Academia de Ciencias de Medicina Preventiva China;

② Cepas del virus Coxsackie B₃ (CVB₃): estaba disponible en EE. UU., y fueron conservadas por nuestra oficina de investigación y enseñanza;

③ Cepas de Coxsackievirus A16 (CoxA16) y cepas de enterovirus EV71: fueron donadas por el Hospital Nacional Sendai de Japón y conservadas por la Oficina de Investigación y Enseñanza solicitante;

④ el adenovirus (Adv) estaba disponible en el Departamento de Investigación Pediátrica del Primer Hospital de la Universidad Médica Norman Bethune;

⑤ El virus del herpes zóster simple tipo I (HSV-1) se adquirió a través del Instituto de Control de Productos Farmacéuticos y Biológicos del Ministerio de Salud.

(4) Equipo principal y reactivos:

cabina de seguridad biológica: BHC-1300 II A/B3, AIRTECH;

incubadora de CO₂: MCO-18AIC, SANYO;

microscopio invertido: CKX41, OLYMPUS;

balanza analítica electrónica: AR1140/C, DHAUS;

medio de cultivo: DMEM, HyClone;

siero fetal bovino: HyClone;

tripsina: Gibco;

MTT: Sigma;

DMSO: Tianjin Beilian Fine Chemicals Development Co., Ltd.

1.2 Procedimiento de prueba

(1) Preparación de células

Las células Vero se subcultivaron durante 1-2 días para formar una película y se trataron con la enzima pancreática cuando la línea límite era clara y el sentido tridimensional y las dioptrías eran fuertes; cuando había pocillos en forma de punta en la superficie celular, la digestión se drenó por completo y las células se dispersaron con varios mililitros de medio de cultivo, se contaron y se diluyeron hasta aproximadamente 5×10^7 células/l con el medio de cultivo (DMEM que contiene suero fetal bovino al 10%) y se inoculó en una placa de cultivo de 96 pocillos hasta que las células se cultivaron en una monocapa.

(2) Determinación de la toxicidad del fármaco

Prueba de citotoxicidad: los fármacos se diluyeron de acuerdo con las concentraciones que se muestran en la Tabla 1-1 para la determinación de la citotoxicidad.

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

<div> <div>gradiente de concentración</div> <div>fármaco</div> </div>	gradiente 1	gradiente 2	gradiente 3	gradiente 4	gradiente 5	gradiente 6	gradiente 7	gradiente 8
filirina	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,078125
filigenina	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,078125
composición A de filirina/filigenina	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,078125
composición B de filirina/filigenina	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,078125
Ribavirina	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125	0,039063
fosfato de oseltamivir	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625

Los fármacos anteriores, que se diluyeron con una solución de mantenimiento (DMEM que contenía 2% de suero fetal bovino) y tenían diferentes concentraciones, se añadieron gota a gota a la célula de monocapa de Vero, 0,2 ml por cada pocillo, los fármacos se añadieron por sextuplicado en 6 pocillos respectivamente. Además, se establecieron 6 pocillos como grupo de control normal (sin fármacos) mientras que otros 6 pocillos como grupo de control en blanco (solo medio). Las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C bajo CO₂ al 5%. El CPE se observó con un microscopio invertido y se registró todos los días. Después de 72 h, se añadieron 20 µl de solución de MTT (5 mg · ml⁻¹) a cada pocillo para continuar la incubación durante 4 h. El medio de cultivo de cada pocillo se aspiró y se desechó, se añadieron 100 µl de DMSO a cada pocillo. Luego, el cultivo se agitó durante 5 min, se midió el valor de DO 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 tóxica media (TC₅₀) de fármacos contra células Vero.

(3) Determinación de TCID₅₀ de varios virus

Se diluyeron varios virus mediante disminución de 10 veces para tener diferentes diluciones de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶, y se inocularon secuencialmente en una placa de cultivo de 96 pocillos con células Vero monocapa, 100 µl para cada pocillo, 6 pocillos para cada dilución y, mientras tanto, se estableció un grupo de control de células normales. Se incubó en CO₂ al 5% a 37 °C durante 2 h, se descartó la solución de virus, luego se agregaron 100 µL de solución de mantenimiento celular a cada pocillo y se continuó incubando en CO₂ al 5% a 37 °C. Los resultados citopáticos se observaron al microscopio a partir del tercer día, y los resultados se determinaron y registraron en el séptimo u octavo día, de manera que se tomó como la mayor dilución capaz de causar que ocurra una lesión positiva en el 50% de los pocillos celulares como el punto final en el que se produjo la lesión positiva y el título del virus se calculó utilizando un procedimiento de Karber.

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

TCID₅₀: 50% de la dosis de infección de histiocitos;
 XM: el logaritmo de la dilución de mayor concentración del virus;
 d: el logaritmo del coeficiente de dilución (múltiple);
 Σpi: la suma del porcentaje de lesión de cada dilución.

(4) Impacto del fármaco sobre los efectos citopáticos inducidos por virus

Se adoptó una placa de cultivo cubierta con células monocapa, se succionó el medio de cultivo y se descartó, se inocularon las células a una cantidad de ataque de virus correspondiente a 100TCID₅₀, se absorbieron en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5% durante 2 h, se añadieron varios fármacos líquidos con concentraciones específicas (aproximadamente la concentración máxima no citotóxica más o menos) y se proporcionaron 6 pocillos para cultivo para cada concentración, 200 µl/pocillo. La inyección de ribavirina y el fosfato de oseltamivir se proporcionaron como el grupo de control positivo del fármaco, y también se proporcionó un grupo de control normal (no se agregó ni virus ni fármaco) y un grupo de control viral (un grupo de control que agregó virus pero no fármaco), y se observó el impacto del fármaco sobre CPE inducido por virus. Después de 72 horas, el valor de DO se midió con una longitud de onda de 492 nm utilizando un procedimiento colorimétrico MTT para calcular la tasa efectiva antiviral (% de TE) de los fármacos. Se utilizó 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.

% de TE = (valor promedio de DO del grupo tratado con el fármaco - el valor promedio de DO del grupo de control del virus) / (el valor promedio de DO del grupo de control celular - el valor promedio de DO del grupo de control de virus) × 100%

1.3 Resultados de la prueba

(3) TCID₅₀ de cada virus

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

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

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

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

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

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

CoxA 16: $\text{LogTCID}_{50} = -2 + 0,5 - \frac{100 + 100 + 100 + 50}{100} = -5$

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.

Las concentraciones máximas no tóxicas (TC₀) y las concentraciones tóxicas medias (TC₅₀) de los diversos fármacos en la célula Vero y las concentraciones de los fármacos usados en la prueba antiviral se pueden ver en la Tabla 1-2.

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

fármaco virus	filirina	filigenina	Composición A de filirina/filigenina	Composición B de filirina/filigenina	Ribavirina	fosfato de oseltamivir
concentración máxima no tóxica	0,0066	0,011	0,010	0,0066	0,065	0,28
concentración tóxica media	0,55	0,297	0,60	0,55	1,392	0,832
0,30	0,01	0,02	0,01	0,01	0,70	0,30

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

La eficacia antiviral de los fármacos sobre la resistencia a varios virus y los resultados del análisis de varianza unidireccional usando un procedimiento ANOVA se observan en la Tabla 1-3 para obtener detalles.

Tabla 1-3. Tabla estadística de la tasa efectiva antiviral (% de TE) de fármacos

fármaco virus	filirina	filigenina	Composición A de filirina/filigenina	Composición B de filirina/filigenina	Ribavirina	Fosfato de oseltamivir
virus de la influenza	75,38**	75,35**	100,00 ***##▲▲△●	97,60***##▲▲△●	57,49**	81,76**
virus de la parainfluenza	84,96**	80,72**	100,00***#▲	99,51***#▲	91,56**	94,52**
CoxA16	75,08**	50,04	98,20***##▲▲△△●●●	97,63***##▲▲△△●●●	0,70	2,95
VSR	80,40**	80,88**	96,22***#▲△△●●●	95,88***#▲△△●●●	50,08*	37,60

(continuación)

fármaco virus	filirina	filigenina	Composición A de filirina/filigenina	Composición B de filirina/filigenina	Ribavirina	Fosfato de oseltamivir
HSV-I	85,00**	84,30**	100,00***#▲▲△●●	99,24,00***#▲▲△●●	62,92**	66,56**
ADV	75,14**	50,61	100,00***#▲▲△△△●●●	96,10***#▲▲△△△●●●	0,43	10,31
EV71	84,85**	75,86**	100,00***#▲▲△△△●●●	98,01***#▲▲△△△●●●	4,25	51,86
CVB ₃	75,27**	50,89	92,67***#▲▲△△△●●●	90,49***#▲▲△△△●●●	13,44	1,64

Nota: comparado con el grupo de control del virus, *P < 0,05, **P < 0,01; cuando se comparó la composición de filirina/filigenina con la filirina, #P < 0,05, ##P < 0,01; cuando se comparó la composición de filirina/filigenina con la filigenina, ▲P < 0,05, ▲▲P < 0,01; cuando se comparó la composición de filirina/filigenina con la ribavirina, △P < 0,05, △△P < 0,01, △△△P 0,001; cuando se comparó la composición de filirina/filigenina con el fosfato de oseltamivir, ●P < 0,05, ●●P < 0,01, ●●●P 0,001;

Como se muestra en los resultados de la Tabla 1-3, la composición de filirina/filigenina tiene efectos inhibidores significativos (P < 0,01 o P < 0,001) en todos los 8 virus y tiene una tasa de eficacia antiviral del 100% sobre el virus de la influenza, el virus de la parainfluenza, los virus del herpes zoster simple tipo I (HSV-I), el enterovirus EV71 y el adenovirus (ADV), y tiene un efecto terapéutico significativamente mejor que la filirina y la filigenina. Esto indica que la composición de filirina/filigenina tiene un efecto sinérgico. Además, la composición de filirina/filigenina tiene un efecto terapéutico significativamente mejor sobre la inhibición de la influenza, el virus Cocksackie A16 (CoxA16), el virus sincitial respiratorio (VSR), los virus del herpes zoster simple tipo I (HSV-I), el adenovirus (ADV), el enterovirus EV71 y el virus Cocksackie B₃ (CVB₃) que el fármaco ribavirina positivo (P < 0,01 o P < 0,001), y tiene un efecto terapéutico significativamente mejor sobre la inhibición para la influenza, el virus Cocksackie A16 (CoxA16), el virus sincitial respiratorio (VSR), los virus del herpes zoster simple tipo I (HSV-I), el adenovirus (ADV), el enterovirus EV71 y el virus Cocksackie B₃ (CVB₃) que el fosfato de oseltamivir (P < 0,05, o P < 0,01, P < 0,001).

2. Prueba antiviral *in vivo*

2.1 Materiales de prueba

(1) Animales de prueba

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

(2) Instrumentos y reactivos experimentales

Nombre del instrumento	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 Technology Co., Ltd.
Microscopio invertido	CKX41	Olympus Instrument
Congelador de temperatura ultrabaja -80 °C	TECON-5082	Australia
Oscilador de baño de agua	HZS-H	Haerbin Donglian Co., Ltd.
Lector de microplacas	TECAN A-5082	Australia
Espectrofotómetro	Model 7550	Japón

2.2 Procedimiento de prueba

(1) Determinación de la dosis letal media de los ratones debido al virus de la influenza y el virus de la parainfluenza

El virus de la influenza y el virus de la parainfluenza (lisado celular) se diluyeron mediante una disminución de 10 veces en líquidos de virus con concentraciones de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵. Se obtuvieron 120 ratones Kunming, 60 de los cuales se proporcionaron para el grupo del virus de la influenza y los 60 restantes para el grupo del virus de la parainfluenza; los 60 ratones se dividieron aleatoriamente en 6 grupos por separado; los ratones se anestesiaron ligeramente con éter y se infectaron con líquidos de virus con diferentes diluciones a razón de 0,03 ml/ratón mediante goteo nasal. Mientras tanto, se estableció el grupo de control en blanco y la suspensión de virus se reemplazó con solución salina. La muerte y la supervivencia se consideraron índices de observación y la observación se realizó todos los días hasta 14 días después de la infección. Aquellos ratones que murieron dentro de las 24 horas posteriores a la infección fueron muertes inespecíficas y no se contaron, y la LD₅₀ del líquido del virus se calculó utilizando el

procedimiento de Karber. La fórmula de cálculo es: $\text{LogLD}_{50} = \text{XM} + \frac{1}{2} \frac{\sum P_i}{d-d_i}$ [en la que: LD₅₀: dosis letal media; XM: el logaritmo de la dilución de mayor concentración de virus; d: el logaritmo del coeficiente de dilución (múltiple); $\sum P_i$: la suma del porcentaje de lesión de cada dilución].

5 (2) Investigación sobre la resistencia de la composición de filirina/filigenina a la neumonía causada por el virus anti-influenza y la infección por virus de parainfluenza.

1) Animales de prueba y grupos

10 Se adoptaron 540 ratones Kunming de cuatro semanas de edad para realizar dos pruebas.

Primero, se adoptaron 270 ratones y se dividieron aleatoriamente en 27 grupos (10 ratones para cada grupo) para la prueba de determinación del índice pulmonar de los ratones infectados por el virus de la influenza y el virus de la parainfluenza y la tasa de inhibición del índice pulmonar de la composición de filirina/filigenina; se adoptaron 90 ratones para cada prueba, y la prueba se repitió 3 veces. Se adoptaron 270 ratones adicionales y se dividieron aleatoriamente en 27 grupos (10 ratones para cada grupo) para la prueba de determinación del título de hemaglutinación de virus en suspensión pulmonar de la composición de filirina y filigenina; se adoptaron 90 ratones para cada prueba, y la prueba se repitió 3 veces.

20 2) Procedimiento de infección

Se colocó algodón desengrasante en un vaso de precipitados de 200-300 ml, y luego se vertió una cantidad adecuada de éter (solo para humedecer el algodón), se invirtió el vaso que contenía el algodón desengrasante y se colocaron los ratones para la anestesia; cuando los ratones estaban extremadamente excitados y evidentemente débiles, se les hizo acostarse boca arriba y se infectaron con el virus de la influenza LD₅₀ 15 y el virus de la parainfluenza por medio de goteo nasal a razón de 0,03 ml/fosa nasal; y la suspensión de virus se reemplazó con solución salina en el grupo de control normal.

30 3) Procedimiento de administración y dosis de administración

El grupo A de la composición de filirina/filigenina, el grupo B de la composición de filirina/filigenina, el grupo de filigenina, el grupo de filirina, el grupo de control de ribavirina y el grupo de control de fosfato de oseltamivir se toman por separado para la administración intragástrica convencional un día antes de la infección; los grupos A y B de la composición de filirina/filigenina fueron grupos de dosis alta, media y baja respectivamente, y las dosis de administración fueron 13,0, 6,5 y 3,25 mg/kg respectivamente; la dosis de administración del grupo de filirina fue de 13 mg/kg, la dosis de administración del grupo de filirina fue de 13 mg/kg, la dosis de administración del grupo de fármaco positivo para ribavirina fue de 58,5 mg/kg, la dosis de administración del grupo de fosfato de oseltamivir fue 19,5 mg/kg, la administración se realizó una vez al día durante 5 días consecutivos y se realizó la perfusión de solución salina normal del mismo volumen para el grupo de control normal y el grupo de control de virus.

40 4) Índice de observación

① Determinación del índice pulmonar

45 En el quinto día después de que se administraron los fármacos a los ratones, primero se prohibió a los ratones beber agua durante 8 horas; luego, una vez pesados los ratones, se les extrajeron los ojos y se sacrificaron los animales mediante exanguinación mediante enucleación ocular. Luego se extrajeron los pulmones 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 usando una balanza electrónica. El índice pulmonar y la tasa de inhibición del índice pulmonar se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

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

55 Tasa de inhibición del índice pulmonar = (índice pulmonar promedio del grupo del modelo de infección - índice pulmonar promedio del grupo de prueba) / índice pulmonar promedio del grupo del modelo de infección × 100%.

② Determinación del título de hemaglutinación del virus en suspensión pulmonar

60 Se tomaron respectivamente varios grupos de pulmones de ratones el quinto día después del tratamiento y se molieron en homogeneizado mediante un homogeneizador a baja temperatura; el homogeneizado se diluyó en un 10% de suspensión de tejido pulmonar con solución salina normal; se realizó una centrifugación para obtener un sobrenadante, que se diluyó dos veces y se goteó a una placa de titulación con 0,2 ml/pocillo; se añadieron 0,2 ml de suspensión de eritrocitos de pollo al 1% en cada pocillo y se mezclaron uniformemente; la placa de titulación se colocó 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 aglutinó para ser (++) y su título se expresó mediante el múltiplo de dilución de la suspensión.

2.3 Resultados de la prueba y análisis

(1) Resultado de la determinación de la dosis letal media de los ratones debido al virus de la influenza y el virus de la parainfluenza

Los ratones Kunming de los grupos de prueba se infectaron respectivamente por vía nasal con 30 µl líquidos de virus de la influenza y virus de la parainfluenza de diferentes concentraciones; en el tercer día de infección, todos los ratones de los tres primeros grupos (grupo 10^{-1} , grupo 10^{-2} y grupo 10^{-3} , de acuerdo con las concentraciones de virus) experimentaron síntomas de la enfermedad de diferentes grados: piel de gallina, temblores, disminución del apetito, etc., al quinto día, los ratones tropiezan; al sexto día, los ratones del grupo de mayor concentración de virus comenzaron a morir, y la muerte se produjo sucesivamente en los grupos restantes al séptimo día después de la infección. Una vez completada la observación de 14 días, se contó la mortalidad de los ratones de cada grupo, y el resultado se puede ver en las Tablas 1-4 y 1-5. Mediante cálculo, la LD_{50} del virus de la influenza fue una dilución de $10^{-2.9}$ y la LD_{50} del virus de la parainfluenza fue una dilución de $10^{-2.5}$.

Tabla 1-4. Estadísticas de los resultados de las pruebas de la dosis letal media del virus de la influenza

Grupo del 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 del blanco	0	10	0%

Se calculó la LD_{50} del virus usando el procedimiento de Karber. El log de la LD_{50} del virus de la influenza fue el siguiente:

$$\text{Log}LD_{50} = \overline{XM} + \frac{1}{2} d - d \frac{\sum P_i}{100} = -1 + 0,5 - (80\% + 60\% + 40\% + 20\% + 0\% + 0\%) = -2,9$$

Tabla 1-5. Estadísticas de los resultados de las pruebas de la dosis letal media 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 del blanco	0	10	0%

Se calculó la LD_{50} del virus utilizando el procedimiento de Karber. El Log de la LD_{50} del virus de la parainfluenza fue el siguiente:

$$\text{Log}LD_{50} = \overline{XM} + \frac{1}{2} d - d \frac{\sum P_i}{100} = -1 + 0,5 - (90\% + 70\% + 40\% + 30\% + 10\% + 0\%) = -2,5$$

(2) Resultados de los efectos de la composición de filirina/filigenina sobre la resistencia a la neumonía causada por las infecciones del virus de la influenza y el virus de la parainfluenza.

① Determinación del índice pulmonar

Después de que los ratones fueron infectados con el virus de la influenza y el virus de la parainfluenza, el resultado del índice pulmonar promedio mostró que: en comparación con el grupo modelo de infección, los índices pulmonares del grupo de control normal, el grupo de filirina (13,0 mg/kg/d), el grupo de filirina (16,0 mg/kg/d), los tres grupos de dosis de las composiciones A y B de filirina/filigenina (grupo de dosis baja 3,25 mg/kg/d, grupo de dosis media 6,5 mg/kg/d, grupo de dosis alta 13,0 mg/kg/d), el grupo de ribavirina y el grupo de fosfato de oseltamivir disminuyen significativamente ($P < 0,05$ o $P < 0,01$), en el que la composición de filirina/filigenina tiene un efecto protector significativo dentro del intervalo de concentración de 3,25 -13,0 mg/kg/d, reduce significativamente todos los índices pulmonares y tiene un efecto terapéutico significativamente mejor sobre la tasa de inhibición del índice de lesión del tejido pulmonar que el grupo de filirina y el grupo de filigenina ($P < 0,01$ o $P < 0,05$). Véase las Tablas 1-6 y 1-7 para ver los resultados.

Tabla 1-6. Tasa de inhibición de la composición de filirina/filigenina con respecto al índice pulmonar de los ratones infectados con el virus de la influenza (n = 3)

Grupos		Dosis de fármaco (mg/kg/d)	Índice pulmonar (\bar{X} (S))	Tasa de inhibición del índice pulmonar	Valor P	Valor P
Grupo de control normal		0	1,274 ± 0,102	-		
Grupo de control del virus		0	1,488 ± 0,084	-		
Grupo de ribavirina		58,5	1,281 ± 0,061	13,90	* < 0,05	
Grupo de fosfato de oseltamivir		19,5	1,178 ± 0,066	19,84	** < 0,01	
Grupo de filirina		13,0	1,280 ± 0,040	14,00	* < 0,05	
Grupo de filigenina		13,0	1,302 ± 0,046	12,51	* < 0,05	
Composición A de filirina/filigenina	Grupo de dosis alta	13,0	1,049 ± 0,056	29,52	** < 0,01	##▲▲ < 0,01
	Grupo de dosis media	6,5	1,129 ± 0,041	24,15	** < 0,01	▲# < 0,05
	Grupo de dosis baja	3,25	1,184 ± 0,039	20,40	** < 0,01	▲# < 0,05
Composición B de filirina/filigenina	Grupo de dosis alta	13,0	1,070 ± 0,056	28,10	** < 0,01	##▲▲ < 0,01
	Grupo de dosis media	6,5	1,131 ± 0,041	24,00	** < 0,01	▲# < 0,05
	Grupo de dosis baja	3,25	1,197 ± 0,039	19,56	** < 0,01	▲# < 0,05

Cuando se compara cada grupo de prueba con el grupo de control del virus, *P < 0,05, **P < 0,01; cuando se compara la composición de filirina/filigenina con la filirina, #P < 0,05, ##P < 0,01; cuando se compara la composición de filirina/filigenina con la filigenina, ▲P < 0,05, ▲▲P < 0,01.

5

Tabla 1-7. Tasa de inhibición de la composición de filirina/filigenina con respecto al índice pulmonar de los ratones infectados con el virus de la parainfluenza (n = 3)

Grupos		Dosis de fármaco (mg/kg/d)	Índice pulmonar (\bar{X} (S))	Tasa de inhibición del índice pulmonar	Valor P	Valor P
Grupo de control normal		0	1,305 ± 0,031	-		
Grupo de control del virus		0	1,591 ± 0,062	-		
Grupo de ribavirina		58,5	1,340 ± 0,065	15,76	* < 0,05	
Grupo de fosfato de oseltamivir		19,5	1,243 ± 0,054	21,85	* < 0,01	
Grupo de filirina		13,0	1,335 ± 0,062	16,10	* < 0,01	
Grupo de filigenina		13,0	1,357 ± 0,050	14,69	* < 0,01	
Composición A de filirina/filigenina	Grupo de dosis alta	13,0	1,068 ± 0,058	32,87	* < 0,01	##▲▲ < 0,01
	Grupo de dosis media	6,5	1,143 ± 0,065	28,13	* < 0,01	▲▲ < 0,05
	Grupo de dosis baja	3,25	1,177 ± 0,044	26,01	* < 0,01	▲# < 0,05
Composición B de filirina/filigenina	Grupo de dosis alta	13,0	1,101 ± 0,058	30,79	* < 0,01	##▲▲ < 0,01
	Grupo de dosis media	6,5	1,158 ± 0,065	27,22	* < 0,01	▲▲ < 0,05
	Grupo de dosis baja	3,25	1,188 ± 0,044	25,30	* < 0,01	▲# < 0,05

Cuando se compara cada grupo de prueba con el grupo de control del virus, *P < 0,05, **P < 0,01; cuando se compara la composición de filirina/filigenina con la filirina, #P < 0,05, ##P < 0,01; cuando se compara la composición de filirina/filigenina con la filigenina, ▲P < 0,05.

② Determinación del título de hemaglutinación del virus en suspensión pulmonar

10

Después de que los ratones se infectaron con el virus de la influenza y el virus de la parainfluenza, los títulos de hemaglutinación del tejido pulmonar (lnX) de los grupos del modelo de infección fueron 32,40 y 33,11 respectivamente; después del tratamiento con las composiciones A y B de filirina/filigenina de diferentes concentraciones durante 5 días, los títulos de hemaglutinación del virus del tejido pulmonar disminuyeron en cierta medida y, en comparación con los grupos de modelos de infección, la diferencia fue significativa (P < 0,01), y sus diferentes grupos de dosis de las

composiciones A y B de filirina/filigenina tienen títulos de hemaglutinación de virus de la influenza y parainfluenza significativamente más bajos que el grupo de filirina y el grupo de filigenina ($P < 0,05$ - $P < 0,001$). Esto indica que la composición de filirina/filigenina tiene el efecto sinérgico y tiene una tasa de inhibición de la proliferación del virus significativamente más alta que el grupo de filirina y el grupo de filigenina ($P < 0,05$ - $P < 0,001$), en la que, los grupos de dosis alta, media y baja de las composiciones A y B de filirina/filigenina tienen una tasa de inhibición significativamente más alta para el título de hemaglutinación en suspensión pulmonar de los ratones infectados con el virus de la influenza que el grupo de filirina y el grupo de filigenina ($P < 0,01$ - $P < 0,001$). Véase las Tablas 1-8 y 1-9 para conocer los detalles de los resultados de las pruebas anteriores.

Tabla 1-8. Impacto de la composición de filirina/filigenina en el título de hemaglutinación en suspensión pulmonar de los ratones infectados con el virus de la influenza (n = 3)

Grupos		Dosis de fármaco (mg/kg/d)	Título de hemaglutinación (lnX)	Tasa de inhibición (%)	Valor P	Valor P
Grupo de control normal		0	0			
Grupo de control del virus		0	32,40 ± 1,105			
Grupo de ribavirina		58,5	21,91:1:1,050	32,39	*<0,01	
Grupo de fosfato de oseltamivir		19,5	20,50 ± 1,123	36,73	*<0,01	
Grupo de filirina		13,0	22,06 ± 1, 120	31,90	*<0,01	
Grupo de filigenina		13,0	22,61 ± 1,059	30,22	*<0,01	
Composición A de filirina/filigenina	Grupo de dosis alta	13,0	17,70 ± 0,618	45,36	*<0,01	###▲▲▲ <0,001
	Grupo de dosis media	6,5	1921 ± 0,450	40,72	*< 0,01	###▲▲ <0,01
	Grupo de dosis baja	3,25	20,71 ± 1,439	36,08	*< 0,01	#▲ <0,05
Composición B de filirina/filigenina	Grupo de dosis alta	13,0	17,70 ± 0,618	45,36	*< 0,01	####▲▲▲ <0,001
	Grupo de dosis media	6,5	19,21 ± 0,450	40,72	*< 0,01	###▲▲ <0,01
	Grupo de dosis baja	3,25	20,71 ± 1,439	36,08	*< 0,01	#▲ <0,05

Tabla 1-9. Impacto de las composiciones de filirina/filigenina sobre los títulos de hemaglutinación en suspensión pulmonar de los ratones infectados con el virus de la parainfluenza (n = 3)

Grupos		Dosis de fármaco (mg/kg/d)	Título de hemaglutinación (lnX)	Tasa de inhibición (%)	Valor P	Valor P
Grupo de control normal		0	0			
Grupo de control del virus		0	33,11 (1,210)			
Grupo de ribavirina		58,5	23,22 (1,091)	29,86	*<0,05	
Grupo de fosfato de oseltamivir		19,5	22,05 (1,055)	33,40	*<0,01	#<005
Grupo de filirina		13,0	23,17 (1,059)	30,01	*<0,01	#<0,05
Grupo de filigenina		13,0	23,79 (1,072)	28,15	*<0,01	#>0,05
Composición A de filirina/filigenina	Grupo de dosis alta	13,0	17,38 (0,955)	47,50	*<0,01	####▲▲▲<0,001
	Grupo de dosis media	6,5	19,04 (0,501)	42,49	*<001	####▲▲▲<0,01
	Grupo de dosis baja	3,25	20,36 (0,824)	38,52	*<0,01	###▲▲ <0,01
Composición B de filirina/filigenina	Grupo de dosis alta	13,0	17,97 (0,955)	45,73	*<0,01	####▲▲▲<0,001
	Grupo de dosis media	6,5	19,69 (0,501)	40,52	*<0,01	####▲▲▲<0,01
	Grupo de dosis baja	3,25	20,81 (0,824)	37,15	*<0,01	###▲▲ <0,01

En las Tablas 1-8 y 1-9, cuando se comparó cada grupo de prueba con el grupo de control viral, *P < 0,05, **P < 0,01; cuando se comparó el grupo de la composición de filirina/filigenina con la filirina, #P < 0,05, ##P < 0,01, ###P < 0,001; cuando se comparó el grupo de la composición de filirina/filigenina con el grupo de filigenina, ▲P < 0,05, ▲▲P < 0,01, ▲▲▲P < 0,001.

Ejemplo 2. Pruebas antipirética y antiinflamatoria de la composición de filirina y filigenina**1.1 Materiales de prueba**

(1) Animales de prueba: ratas Wistar, peso: 120 ~250 g, combinación de machos y hembras, animal medicinal No. 13-1225; conejos blancos japoneses, machos, peso corporal: 1,5 ~ 2,0 kg, animal medicinal No. 10-5115. Tanto las ratas como los conejos fueron proporcionados por el Centro de Animales de Experimentación Médica, Changchun Gaoxin y los alimentos para animales fueron proporcionados por el Centro de Animales Experimentales de la Universidad de Jilin.

(2) Fármacos de prueba

① Filirina, polvo blanco, fabricada por Dalian Fusheng Natural Drug Development Co. Ltd., tenía una pureza del 99,5%, que se determinó mediante HPLC equipado con detector UV y detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD) utilizando el procedimiento de normalización de área, y el contenido del mismo se calibró y se confirmó que era del 99,5% con el control estándar de filirina de China Pharmaceutical and Biological Products para la determinación del contenido.

② Filigenina, un polvo blanco, fabricado por Dalian Fusheng Natural Drug Development Co. Ltd., se determinó que su pureza era del 99,1%, determinada por HPLC equipado con detector UV y detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD) utilizando el procedimiento de normalización de área;

③ La composición Filirina/Filigenina, que era un polvo blanco y fabricado por Dalian Fusheng Natural Drug Development Co. Ltd., estaba formada por dos monómeros de filirina y filigenina en una proporción; calibrando usando 99,5% de filirina y 99,1% de filigenina como control, los contenidos de los dos monómeros en la composición de filirina/filigenina fueron ambos del 98%; en el que la relación en peso de forsitina a filigenol en la composición A de forsitina/filigenol fue de 98:2; la relación en peso de filirina a filigenina en la composición B de filirina/filigenina fue 80:20.

1.2 Principales instrumentos y reactivos

Instrumento para medición de la hinchazón de la pata de la rata YLS-7A (estación de equipamiento en la Academia de Ciencias Médicas de Shandong);
Espectrofotómetro 722 (fabricado por Shanghai Spectrum Instruments Ltd.);
Instrumento de medición de temperatura digital portátil (modelo WSC-41 IP, la Third Company of Shanghai Pudong);
Pilocarpina (Tianjin People Pharmaceutical Factory, Lote No. 0130112);
Histamina (Instituto de Bioquímica y Biología Celular, SIBS, CAS, Lote No. 0130115);
5-hidroxitriptamina (Instituto de Bioquímica y Biología Celular, SIBS, CAS, Lote No. 0130623);
Evans blue (Estación de suministro de adquisiciones de reactivos químicos de Shanghai, Lote No. 0130217);
Comprimidos de maleato de clorfeniramina (Changchun Economic Development Zone Pharmaceutical Co., Ltd., Lote No. 0130801);
Carragenina (Instituto Médico de Farmacología de Jilin, Lote No. 0130502);
Comprimidos de paracetamol (Liaoyuan City Baikang Pharmaceutical Co., Ltd., Lote No. 0130512);
Comprimidos de aspirina (Baicheng Wanda Pharmaceutical Co., Ltd., Lote No. 0130305);
Saccharomyces cerevisiae (Beijing AOBXING Bio-tech Co., Ltd., Lote No. 013020);
Vacuna contra la fiebre tifoidea y paratifoidea (Changchun Institute of Biological Products Co., Ltd., Lote No. 0130216).

1.3 Tratamiento estadístico

En el análisis estadístico se utilizaron la prueba de suma de intervalos, la prueba de χ^2 y la prueba t para la comparación de dos muestras.

2.1 Prueba de los efectos de la composición de filirina/filigenina en la secreción de sudor de las patas de la rata (procedimiento de coloración)**(1) Materiales y procedimientos**

La prueba se basa en un mecanismo en el que la distribución de las glándulas sudoríparas está presente en las almohadillas de las patas de las ratas, la cantidad de secreción de sudor y la variación de la misma se puede observar mediante el uso de un mecanismo en el que se puede producir un color púrpura al poner en contacto el yodo y el almidón cuando se encuentra con el sudor.

Se utilizaron 500 ratas Wistar con igual número de machos y hembras, con un peso de 120 ~150 g. Estas ratas se dividieron aleatoriamente en 50 grupos por peso y sexo, es decir, 5 grupos para los grupos de control (0,5% de

metilcelulosa), 5 grupos para los grupos de filirina, 5 grupos para los grupos de filigenina, 5 grupos para los grupos de dosis baja, media y alta (2,5, 5, 10 mg/kg, respectivamente) de las composiciones A y B de filirina/filigenina, respectivamente, y 5 grupos para los grupos positivos para el fármaco pilocarpina (35 mg/kg). Cada grupo tiene 10 ratas, se utilizan 10 grupos de ratas para cada prueba, que tiene 5 períodos de tiempo (1, 5, 10, 15 y 20 min). Las ratas se colocaron en una bolsa de fijación para ratas de fabricación propia y se expusieron ambas extremidades traseras de las ratas. La suciedad de las patas derechas se limpió suavemente con hisopos de algodón que contenían alcohol anhidro. La solución de pilocarpina se administró por inyección subcutánea, los grupos restantes se sometieron a administración intragástrica. A la hora (30 minutos para el grupo de pilocarpina) después de la administración, el sudor preexistente y el sudor generado debido a la lucha en la pata derecha de cada rata en cada grupo se limpió suavemente con hisopos de algodón secos, luego las patas se recubrieron con la solución A (disolviendo 2 g de yodo en 100 ml de alcohol anhidro) de reactivo de Hetian-gaoyuanshi. Después de secarse por completo, las patas se recubrieron finamente con la solución B (mezcla uniforme de 50 g de almidón soluble y 100 ml de aceite de ricino) de reactivo de Hetian-gaoyuanshi. El color y el número de manchas de color púrpura oscuro (es decir, manchas de sudor) se observaron cuidadosamente a los 1, 5, 10, 15 y 20 minutos después del recubrimiento de la solución B, respectivamente, con una lupa. Una vez finalizada la prueba, se realizó el tratamiento estadístico de acuerdo con la prueba de suma de intervalos con comparación de dos muestras, comparando así las diferencias entre los distintos grupos.

(2) Resultados

En comparación con el grupo de control, los grupos de dosis media y alta (5, 10 mg/kg) de las composiciones de filirina/filigenina tienen ambos efectos promotores significativos sobre la secreción de sudor de las patas de la rata a los 10, 15 y 20 minutos después del recubrimiento de la solución B ($p < 0,05$), y el grupo de 2,5 mg/kg de las composiciones de filirina/filigenina tiene un efecto promotor significativo sobre la secreción de sudor de las patas de la rata a los 15 y 20 minutos después del recubrimiento de la solución B ($p < 0,05$). Sus funciones sudoríficas eran aproximadamente equivalentes a las del fármaco positivo para pilocarpina, y estos grupos tenían características de promover lentamente la secreción de sudor de las patas de las ratas. El grupo de dosis alta de la composición de filirina/filigenina tiene un efecto de estimulación significativamente mejor sobre la secreción de sudor de las patas de la rata a los 10, 15 y 20 minutos después del recubrimiento de la solución B que la filirina y la filigenina ($p < 0,05$). El grupo de dosis media de la composición de filirina/filigenina tiene un efecto de estimulación significativamente mejor sobre la secreción de sudor de las patas de la rata a los 10 y 15 minutos después del recubrimiento de la solución B que la filirina y la filigenina ($p < 0,05$). El grupo de dosis baja de la composición de filirina/filigenina tiene un efecto de estimulación significativamente mejor sobre la secreción de sudor de las patas de la rata a los 15 minutos después del recubrimiento de la solución B que la filirina y la filigenina ($p < 0,05$). Los resultados anteriores mostraron que la composición de filirina/filigenina tiene un efecto significativamente mejor sobre la promoción de la secreción de sudor de las patas de la rata que la filirina y la filigenina. Véanse las Tablas 2-1, 2-2, 2-3, 2-4 y 2-5 para obtener más detalles.

TABLA 2-1. Efectos de la composición de filirina/filigenina sobre la secreción de sudor de las patas de ratas normales (procedimiento de coloración)

Grupos	Número de animales	Número de animales de manchas de sudor de cada nivel después de la solución de recubrimiento B durante 1 minuto (ratas)					Valor P
		-	+	++	+++	++++	
Grupo de control	10	2	2	3	2	1	
Filirina	10	0	2	2	2	4	> 0,05
Filigenina	10	0	1	3	3	3	> 0,05
Pilocarpina 35,0 mg/kg	10	0	1	3	1	5	> 0,05
Composición A de filirina/filigenina							
2,5 mg/kg	10	0	2	2	1	5	> 0,05
5,0 mg/kg	10	0	2	2	1	5	> 0,05
10,0 mg/kg	10	0	2	2	1	5	> 0,05
Composición B de filirina/filigenina							
2,5 mg/kg	10	0	3	2	0	5	> 0,05
5,0 mg/kg	10	0	3	1	1	5	> 0,05
10,0 mg/kg	10	0	3	1	1	5	> 0,05

TABLA 2-2. Efectos de la composición de filirina/filigenina sobre la secreción de sudor de las patas de ratas normales (procedimiento de coloración)

Grupos	Número de animales	Número de animales de manchas de sudor de cada nivel después de la solución de recubrimiento B durante 5 minutos (ratas)					Valor P
		-	+	++	+++	++++	
Grupo de control	10	0	4	1	4	1	
Filirina	10	0	1	2	2	5	> 0,05
Filigeninina	10	0	1	3	2	4	> 0,05
Pilocarpina 35,0 mg/kg	10	0	1	2	1	6	< 0,05*
Composición A de filirina/filigenina							
2,5 mg/kg	10	0	0	1	4	5	> 0,05
5,0 mg/kg	10	0	1	1	3	5	> 0,05
10,0 mg/kg	10	0	1	3	2	5	> 0,05
Composición B de filirina/filigenina							
2,5 mg/kg	10	0	2	2	1	5	> 0,05
5,0 mg/kg	10	0	1	2	2	5	> 0,05
10,0 mg/kg	10	0	1	3	1	5	> 0,05

TABLA 2-3. Efectos de la composición de filirina/filigenina sobre la secreción de sudor de las patas de ratas normales (procedimiento de coloración)

Grupos	Número de animales	Número de animales de manchas de sudor de cada nivel después de la solución de recubrimiento B durante 10 minutos (ratas)					Valor P
		-	+	++	+++	++++	
Grupo de control	10	0	3	2	4	1	
Filirina	10	0	1	1	3	5	> 0,05
Filigeninina	10	0	1	3	1	5	> 0,05
Pilocarpina 35,0 mg/kg	10	0	0	2	1	6	< 0,05*
Composición A de filirina/filigenina							
2,5 mg/kg	10	0	0	1	4	5	> 0,05
5,0 mg/kg	10	0	2	1	1	6	< 0,05* [▲]
10,0 mg/kg	10	0	1	2	4	6	< 0,05* [▲]
Composición B de filirina/filigenina							
2,5 mg/kg	10	0	0	2	3	5	> 0,05
5,0 mg/kg	10	0	3	0	1	6	< 0,05* [▲]
10,0 mg/kg	10	0	1	1	1	6	< 0,05* [▲]

5 **TABLA 2-4. Efectos de la composición de filirina/filigenina sobre la secreción de sudor de las patas de ratas normales (procedimiento de coloración)**

Grupos	Número de animales	Número de animales de manchas de sudor de cada nivel después de la solución de recubrimiento B durante 15 minutos (ratas)					Valor P
		-	+	++	+++	++++	
Grupo de control	10	0	3	2	4	1	
Filirina	10	0	1	2	4	5	< 0,05*
Filigeninina	10	0	1	1	3	5	> 0,05
Pilocarpina 35,0 mg/kg	10	0	0	2	1	6	< 0,05*
Composición A de filirina/filigenina							
2,5 mg/kg	10	0	2	1	1	6	< 0,05* [▲]
5,0 mg/kg	10	0	1	2	1	6	< 0,05* [▲]
10,0 mg/kg	10	0	0	3	1	6	< 0,05* [▲]
Composición B de filirina/filigenina							
2,5 mg/kg	10	0	3	0	1	6	< 0,05* [▲]
5,0 mg/kg	10	0	2	1	1	6	< 0,05* [▲]
10,0 mg/kg	10	0	1	2	1	6	< 0,05* [▲]

TABLA 2-5. Efectos de la composición de filirina/filigenina sobre la secreción de sudor de las patas de la ratas normales (procedimiento de coloración)

Grupos	Número de animales	Número de animales de manchas de sudor de cada nivel después de la solución de recubrimiento B durante 20 minutos (ratas)					Valor P
		-	+	++	+++	++++	
Grupo de control	10	0	3	2	4	1	
Filirina	10	0	0	4	0	6	< 0,05*
Filigenina	10	0	0	1	4	5	< 0,05*
Pilocarpina 35,0 mg/kg	10	0	0	2	1	6	< 0,05*
Composición A de filirina/filigenina							
2,5 mg/kg	10	0	1	2	1	6	< 0,05*
5,0 mg/kg	10	0	0	3	1	6	< 0,05*
10,0 mg/kg	10	0	0	2	2	6	< 0,05*#▲
Composición B de filirina/filigenina							
2,5 mg/kg	10	0	2	1	1	6	< 0,05*
5,0 mg/kg	10	0	1	2	1	6	< 0,05*
10,0 mg/kg	10	0	0	2	2	6	< 0,05*#▲

Estándares de evaluación para los niveles de manchas de sudor:

"-" sin mancha de sudor en la superficie de la almohadilla de la pata de la rata;

"+" mancha de sudor ocasionalmente observada en la superficie de la almohadilla de la pata de la rata, con un área de sudor por debajo de aproximadamente el 10% de la superficie de la pata;

"++" mancha de sudor dispersa en la superficie de la almohadilla de la pata de la rata, con un área de sudor de aproximadamente el 11-40% de la superficie de la pata;

"+++" mancha de sudor dispersa en la superficie de la almohadilla de la pata de la rata, con un área de sudoración de aproximadamente el 41-70% de la superficie de la pata;

"++++" mancha de sudor distribuida uniformemente en la superficie de la almohadilla de la pata de la rata, con un área de sudoración de más del 71% de la superficie de la pata. Comparación entre cada grupo de prueba y el grupo de control viral, *P <0,05; comparación entre la composición de filirina/filigenina con filirina, #P <0,05. Comparación entre la composición de filirina/filigenina con filigenina, ▲P <0,05.

2.2 Efectos de la composición de filirina/filigenina sobre la secreción de sudor de las patas de la rata (procedimiento de observación histomorfológica)

(1) Materiales y procedimientos

Esta prueba se basa en un mecanismo en el que cuando una rata está en un estado excitado, además del aumento de la secreción de sudor de las glándulas sudoríparas, la morfología de las células epiteliales de las glándulas sudoríparas cambia en consecuencia. Bajo un microscopio óptico, se puede ver que las vacuolas de las células epiteliales de las glándulas sudoríparas aumentan en número y se expanden. Bajo un microscopio electrónico, estas vacuolas expandidas parecen ser mitocondrias en la inflamación, rotura y fusión de las células epiteliales de las glándulas sudoríparas y expansión de la vesícula secretora. Por lo tanto, mediante la observación histomorfológica del tejido epitelial de la glándula sudorípara de la pata de una rata, se pueden conocer las actividades secretoras de la glándula sudorípara.

Se utilizaron 300 ratas Wistar con el mismo número de machos y hembras, con un peso de 120 ~160 g. Estas ratas se dividieron aleatoriamente en 30 grupos por peso y sexo: grupos de control (0,5% de metilcelulosa), grupos de filigenina, grupos de filirina, grupos de dosis baja, media y alta (2,5, 5, 10 mg/kg) composiciones A y B de filirina/filigenina por separado, y los grupos del fármaco positivo para pilocarpina (35 mg/kg). Cada grupo tiene 10 ratas, la prueba se repite 3 veces para cada grupo. La solución de pilocarpina se administró por inyección subcutánea, los grupos restantes se sometieron a administración intragástrica. Después de la administración del 0,5% de metilcelulosa en el grupo de control durante una hora, después de la administración de la pilocarpina en el grupo positivo para el fármaco durante 30 minutos, y después de la administración de la filirina, la filigenina y la composición de filirina/filigenina durante una hora, se cortó instantáneamente la extremidad trasera derecha en la articulación del tobillo para desmontar inmediatamente la almohadilla de la pata trasera derecha y se colocó en una solución de formaldehído al 10%. Las almohadillas de las patas se fijaron, deshidrataron, incrustaron, cortaron y tiñeron con HE mediante procedimientos convencionales. Los cambios en las células epiteliales de las glándulas sudoríparas de las patas de la rata de cada grupo se observaron bajo un microscopio óptico, para observar principalmente el porcentaje

de vacuolización. Las diferencias entre los distintos grupos se realizaron mediante la prueba de χ^2 para análisis estadístico. La prueba anterior se repitió 3 veces.

Porcentaje de vacuolización = (el número de glándulas sudoríparas vacuolizadas)/(el número de glándulas sudoríparas observadas) \times 100%.

(2) Resultados

En comparación con el grupo de control, se observó un efecto promotor extremadamente significativo sobre la secreción de sudor de las patas de la rata ($p < 0,001$) de los grupos de 2,5, 5, 10 mg/kg de las composiciones A y B de filirina/filigenina, los grupos de dosis baja, media y alta (2,5, 5, 10 mg/kg) de las composiciones de filirina/filigenina tienen efectos terapéuticos significativamente mejores que la filirina y la filigenina ($p < 0,001$ o $p < 0,01$). Esto demostró que las composiciones de filirina/filigenina tienen efectos sinérgicos. Véase la Tabla 2-6 para conocer los detalles de los resultados de la prueba.

TABLA 2-6. Efectos de la composición de filirina/filigenina sobre la secreción de sudor de las patas de la rata (procedimiento de observación histomorfológica, n = 3)

Grupos	Número de animales	Número de glándulas sudoríparas observadas	Número de glándulas sudoríparas de vacuola	Porcentaje de vacuolización (%)
Grupo de control	10	242	14	5,78
Filirina	10	209	86	22,15**
Filigenina	10	212	79	20,26**
Pilocarpina (35,0 mg/kg)	10	208	57	27,40***
Composición A de filirina/filigenina				
2,5 mg/kg	10	221	25	30,31 ****#▲▲
5,0 mg/kg	10	213	73	34,27 ****#▲▲▲
10,0 mg/kg	10	207	85	41,63 ****#▲▲▲
Composición B de filirina/filigenina				
2,5 mg/kg	10	225	66	29,30 ****#▲▲
5,0 mg/kg	10	219	69	31,51 ****#▲▲▲
10,0 mg/kg	10	208	85	40,86 ****#▲▲▲

en comparación con el grupo de control viral, **p < 0,01, ***p < 0,001; cuando se comparó la composición de filirina/filigenina con la filirina, ##p < 0,01, ###p < 0,001; cuando se comparó la composición de filirina/filigenina con la filigenina, ▲▲p < 0,01, ▲▲▲p < 0,001.

2.3 Efectos de la composición de filirina/filigenina sobre la fiebre de las ratas inducida por la levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*)

(1) Materiales y procedimientos

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 180 ~ 200 g. La temperatura anal normal de cada rata se midió dos veces (en un cierto intervalo) con un termómetro digital portátil WSC-411P, y se tomó la media de los dos valores de medición como la temperatura corporal normal de la rata. Luego, se seleccionaron 300 ratas con temperatura corporal de 36,5 ~ 38 °C y se dividieron aleatoriamente en 30 grupos por peso: grupos modelo (0,5% de metilcelulosa), composiciones A y B de filirina/filigenina que se dividen en grupos de dosis baja, media y alta (2,5, 5, 10 mg/kg) respectivamente, grupos de filirina (13 mg/kg), grupos de filigenina (13 mg/kg) y grupos positivos para el fármaco paracetamol (100 mg/kg). Cada grupo tiene 10 ratas y la prueba se repite 3 veces para cada grupo. Se inyectaron subcutáneamente 10 ml/kg de suspensión fresca de *Saccharomyces cerevisiae* al 10% en el lomo de las ratas de cada grupo para inducir fiebre. Después de la administración de una suspensión fresca de *Saccharomyces cerevisiae* al 10% durante 6,0 h, se administraron la composición de filirina/filigenina y el fármaco positivo para paracetamol por administración intragástrica, y se administra el mismo volumen de 0,5% de metilcelulosa al grupo modelo mediante administración intragástrica. Las temperaturas rectales se midieron respectivamente 1, 2, 3 y 4 h después de la administración. Se observaron cambios en la temperatura corporal y se comparó la diferencia entre los grupos mediante el procesamiento de la prueba t entre grupos a través del porcentaje antipirético. La prueba anterior se repitió en total 3 veces.

(Temperatura corporal en un momento determinado después de la administración)
- (Temperatura corporal a las 6 h después de la inducción de la fiebre)

Porcentaje de antipirético = $\frac{\text{Temperatura corporal en un momento determinado después de la administración} - \text{Temperatura corporal a las 6 h después de la inducción de la fiebre}}{\text{Temperatura corporal a las 6 h después de la inducción de la fiebre}} \times 100\%$

(2) Resultados

Las temperaturas de las ratas en cada grupo aumentaron todas aproximadamente 1,5 °C después de la administración subcutánea de suspensión fresca de *Saccharomyces cerevisiae* al 10% durante 6 h, y fueron significativamente diferentes de las temperaturas antes de la inducción de la fiebre ($p < 0,001$). Esto indicó que el modelo de fiebre inducida por levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) para ratas se estableció con éxito. En comparación con el grupo modelo, se observaron efectos de hipotermia significativos sobre la fiebre de las ratas inducida por *Saccharomyces cerevisiae* ($p < 0,05 \sim p < 0,001$) en los grupos de dosis media y alta de las composiciones A y B de filirina/filigenina a 1, 2, 3 y 4 h después de la administración, así como el grupo de dosis baja a las 2, 3 y 4 h después de la administración. Mientras tanto, los efectos de la hipotermia de los grupos con diferentes dosis de las composiciones A y B de filirina/filigenina fueron extremadamente superiores a los efectos de la filirina y la filigenina ($p < 0,0011$ o $p < 0,01$), lo que indicó que las composiciones de filirina/filigenina tienen efectos sinérgicos evidentes. Véase la Tabla 2-7 para los resultados de la prueba anterior.

2.4 Efectos de las composiciones de filirina/filigenina sobre la fiebre de los conejo inducida por la vacuna tifoidea y paratifoidea**(1) Materiales y procedimientos**

Se utilizaron conejos blancos machos japoneses de orejas grandes con un peso de 1,5 ~ 2,0 kg. Antes de la prueba, se utilizó un termómetro digital portátil WSC-411P para medir la temperatura rectal normal dos veces (con cierto intervalo para cada tiempo), y el valor promedio se tomó como la temperatura corporal normal de los conejos. Luego, se seleccionaron 198 conejos con temperatura corporal de 38 ~ 39,6 °C y se dividieron aleatoriamente en 33 grupos por peso: grupos de control de blanco (solución salina normal), grupos de control modelo (0,5% de metilcelulosa), grupos de dosis baja, media y alta (1,25, 2,5, 5 mg/kg) de las composiciones A y B de filirina/filigenina, grupos de filirina, grupos de filigenina y grupos de fármacos positivos para paracetamol (50 mg/kg). Cada grupo tiene 6 conejos y la prueba se repitió 3 veces para cada grupo. Los conejos se fijaron en un fijador. El grupo de control de blanco se inyectó por vía intravenosa con solución salina normal de 1 ml/kg a través del borde de la oreja; el grupo de control modelo y cada grupo de fármacos se inyectaron por vía intravenosa con vacunas contra la fiebre tifoidea y paratifoidea de 0,8 ml/kg a través del borde de la oreja. Después de que la temperatura corporal de los conejos aumentara 1 °C o más (requiriendo alrededor de 1 ~ 1,5 h, y esta prueba se limitó a 1 h), el grupo de control de blanco y el grupo modelo se administraron por vía intragástrica con 0,5% de carboximetilcelulosa de 1 ml/kg, y los grupos de fármacos se administraron por vía intragástrica con composiciones de filirina/filigenina y paracetamol, respectivamente. La temperatura rectal se midió después de la administración durante 30, 60, 90, 120, 180 y 240 min para observar los cambios en la temperatura corporal, y la diferencia entre los grupos se comparó mediante el procesamiento de la prueba t entre grupos mediante el porcentaje de antipirético.

$$\text{Porcentaje de antipirético} = \frac{(\text{Temperatura corporal en un momento determinado después de la administración}) - (\text{Temperatura corporal 1 h después de la inducción de la fiebre})}{(\text{Temperatura corporal 1 h después de la inducción de la fiebre})} \times 100\%$$

(2) Resultados

Después de la inyección intravenosa con las vacunas tifoidea y paratifoidea a través del borde de la oreja de los conejos durante 1 h, el aumento de la temperatura corporal fue de aproximadamente 1 °C, lo que indicó que las vacunas tifoidea y paratifoidea podrían usarse para preparar el modelo de fiebre del conejo. En comparación con el grupo de control de blanco, las temperaturas corporales de los conejos del grupo modelo aumentaron continuamente durante un período de observación de 300 min ($p < 0,05 \sim p < 0,001$). En comparación con el grupo modelo, los grupos de dosis alta, media y baja de las composiciones A y B de filirina/filigenina después de la administración durante 30 ~ 240 min, 60 ~ 240 min y 90 ~ 240 min tuvieron efectos hipotérmicos significativos sobre la fiebre del conejo inducida por la vacuna tifoidea y paratifoidea ($p < 0,05 \sim p < 0,001$), y sus efectos hipotérmicos también fueron significativamente superiores a los efectos del grupo de filirina y del grupo de filigenina ($p < 0,01$), lo que indicó que las composiciones de filirina/filigenina tienen efectos sinérgicos obvios. Véase la Tabla 2-8 para los resultados de la prueba anterior.

2.5 Efectos de las composiciones de filirina/filigenina sobre la hinchazón de la pata de la rata inducida por carragenina**(1) Materiales y procedimientos**

Se adoptaron 70 ratas Wistar macho con un peso de 120 ~ 150 g y se dividieron aleatoriamente en 7 grupos por peso: un grupo de control de blanco (0,5% de carboximetilcelulosa de sodio), grupos de dosis baja, media y alta (2,5, 5 y 10 mg/kg) de la composición A de filirina/filigenina, un grupo de filirina, un grupo de filigenina y un grupo de fármaco positivo para aspirina (100 mg/kg). Cada grupo tiene 10 ratas. Todas las ratas en cada grupo recibieron la administración mediante inyección subcutánea a través de la vena sublingual. Se midió el volumen normal de la pata trasera derecha de cada rata en cada grupo en el procedimiento de medición de aumento capilar. Para evitar errores,

la medición debe realizarse en una posición fija y ser operada por la misma persona antes y después de la administración. Se tomó una media de los dos valores de medición como el volumen normal de la pata trasera derecha de una rata antes de la administración. Después de la administración, se inyectaron inmediatamente por vía subcutánea a las ratas 0,1 ml de carragenina al 1% en las patas traseras derechas para inducir la inflamación. Se midieron los volúmenes de las patas traseras derechas de ratas a los 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos después de la inducción de la inflamación. La diferencia entre los grupos se comparó mediante el procesamiento de la prueba t entre grupos a través del porcentaje de diferencia (relación de hinchamiento) del volumen de la pata antes y después de la inflamación inducida en la rata.

$$\text{Porcentaje de hinchazón (\%)} = \frac{(\text{Volumen de la pata trasera derecha después de la inducción de la inflamación}) - (\text{Volumen de la pata trasera derecha después de la administración})}{(\text{Volumen de la pata trasera derecha después de la administración})} \times 100\%$$

Resultados

En comparación con el grupo de control de blanco, el grupo de dosis alta (10 mg/kg) de las composiciones de filirina/filigenina dentro de los 15 ~ 360 minutos después de la administración, así como el grupo de dosis media (5 mg/kg) y el grupo de dosis baja (2,5 mg/kg) de las composiciones de filirina/filigenina dentro de los 30 ~ 360 min posteriores a la administración tuvieron efectos inhibidores obvios sobre la hinchazón de la pata de la rata inducida por carragenina ($p < 0,05$ o $p < 0,01$), y sus efectos terapéuticos fueron significativamente mejores que los efectos del grupo de filirina (10 mg/kg) y del grupo de filigenina (10 mg/kg) ($p < 0,05$ o $p < 0,01$); además, los efectos terapéuticos de cada grupo de dosis de la composición a los 60 minutos y 240 minutos después de la administración fueron significativamente mejores que los efectos del grupo de filigenina ($p < 0,01$). Los resultados de las pruebas anteriores indicaron que el uso combinado de la filirina y la filigenina en la composición de filirina/filigenina tiene un efecto sinérgico obvio (Véase la Tabla 2-9 para obtener detalles).

TABLA 2-7. Efectos de las composiciones de filirina/filigenina sobre las temperaturas corporales de conejos febriles inducidos por la vacuna tifoidea y paratifoidea ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Grupos	Normal	6 h después de inducción de fiebre	Temperatura corporal (°C) Tiempo después de la administración (h)			
			1	2	3	4
Grupo modelo de control (%)	37,72 ± 0,90	39,30 ± 0,54	39,44 ± 0,58	39,42 ± 0,47	38,88 ± 0,46	38,57 ± 0,49
Paracetamol 100 mg/kg (%)	37,55 ± 0,70	39,48 ± 0,62	38,66 ± 0,59	38,19 ± 0,59	37,98 ± 0,19	37,84 ± 0,32
Filirina 10 mg/kg (%)	37,58 ± 0,59	39,53 ± 0,54	39,13 ± 0,52	38,77 ± 0,42	38,63 ± 0,40	38,46 ± 0,31
Filigenina 10 mg/kg (%)	37,50 ± 0,59	39,44 ± 0,47	39,31 ± 0,48	39,04 ± 0,45	38,91 ± 0,40	38,70 ± 0,31
Composición A de filirina/filigenina 2,5 mg/kg (%)	37,33 ± 0,51	39,23 ± 0,63	38,86 ± 0,47	38,20 ± 0,44	37,85 ± 0,52	38,52 ± 0,59
5,0 mg/kg (%)	37,41 ± 0,55	39,37 ± 0,41	38,61 ± 0,52	38,46 ± 0,55	38,22 ± 0,32	37,84 ± 0,41
10,0 mg/kg (%)	37,53 ± 0,59	39,54 ± 0,62	38,69 ± 0,57	37,72 ± 0,40	37,27 ± 0,42	37,08 ± 0,35
Composición B de filirina/filigenina 2,5 mg/kg (%)	37,55 ± 0,70	39,48 ± 0,62	39,26 ± 0,47	38,97 ± 0,41	38,59 ± 0,35	38,30 ± 0,50
		5,14 ± 1,42###	-0,87 ± 1,12▲	-1,59 ± 1,18▲	-2,54 ± 1,32**▲	-3,29 ± 1,81***▲

(continuación)

Grupos	Normal	6 h después de inducción de fiebre	Temperatura corporal (°C)		Tiempo después de la administración (h)	
			1	2	3	4
Composición B de filirina/filigenina						
5,0 mg/kg (%)	37,58 ± 0,59	39,53 ± 0,54	38,76 ± 0,56	38,57 ± 0,52	38,35 ± 0,40	37,95 ± 0,38
		5,18 ± 1,52 ^{###}	-1,80 ± 0,50 ^{▲▲}	-2,27 ± 0,50 ^{**▲▲}	-2,84 ± 0,31 ^{**▲}	-3,85 ± 0,44 ^{***▲▲▲}
10,0 mg/kg (%)	37,50 ± 0,59	39,44 ± 0,47	38,71± 0,49	38,39 ± 0,48	38,24 ± 0,37	37,90 ± 0,31
		5,17 ± 1,37 ^{###}	-1,95 ± 0,58 ^{▲▲▲}	-2,76 ± 0,85 ^{**▲▲▲}	-3,15 ± 1,10 ^{***▲▲▲}	-4,00 ± 1,12 ^{***▲▲▲}
Cuando se compara con el grupo de control del modelo, *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001; en comparación con el grupo normal (antes de la inducción de fiebre), ###p <0,001. Cuando se comparó el porcentaje antipirético de la composición de filirina/filigenina con el de la filirina, ▲p <0,05; ▲▲p <0,01; ▲▲▲p <0,001; cuando se comparó el porcentaje antipirético de la composición de filirina/filigenina con el de la filigenina, ▲p <0,05; ▲▲p <0,01; ▲▲▲p <0,001.						

TABLA 2-8. Efectos de las composiciones de filirina/filigenina sobre la temperatura corporal de conejos febriles inducidos por la vacuna tifoidea y paratifoidea ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Grupos	Normal	1 h después de inducción de fiebre	Temperatura corporal (°C)					
			Tiempo después de la administración (min)					
			30	60	90	120	180	240
Control de blanco	39,47 ± 0,25	39,50 ± 0,21	39,56 ± 0,24	39,45 ± 0,20	39,54 ± 0,22	39,49 ± 0,23	39,56 ± 0,27	39,59 ± 0,26
grupo (%)		0,15 ± 0,25	0,15 ± 0,25	-0,13 ± 0,15	0,11 ± 0,14	-0,02 ± 0,10	0,15 ± 0,24	0,23 ± 0,08
Control del modelo	39,68 ± 0,54	41,10 ± 0,51###	41,23 ± 0,52	41,27 ± 0,52##	41,22 ± 0,52#	41,21 ± 0,51*	40,95 ± 0,48##	40,49 ± 0,57###
grupo (%)		3,60 ± 1,03	0,32 ± 0,28	0,41 ± 0,19	0,28 ± 0,15	0,26 ± 0,29	-0,36 ± 0,22	-1,48 ± 0,25
Paracetamol								
50 mg/kg	39,53 ± 0,49	40,09 ± 0,41###	40,53 ± 0,65**	40,10 ± 0,49***	39,83 ± 0,58***	39,72 ± 0,56***	39,61 ± 0,41***	39,53 ± 0,47***
(%)		3,71 ± 0,27	-1,14 ± 0,56	-2,18 ± 0,17	-2,83 ± 0,15	-3,11 ± 0,20	-3,38 ± 0,22	-3,58 ± 0,38
Filirina								
5,2 mg/kg	39,59 ± 0,30	40,98 ± 0,23###	40,83 ± 0,26	40,58 ± 0,21	40,43 ± 0,22	40,37 ± 0,27	40,16 ± 0,23	39,92 ± 0,25
(%)		3,52 ± 0,41	-0,37 ± 0,15	-0,61 ± 0,12	-0,97 ± 0,27	-1,13 ± 0,14**	-1,65 ± 0,12**	-2,22 ± 0,11***
Filigenina								
5,2 mg/kg	39,63 ± 0,30	41,10 ± 0,24###	41,06 ± 0,26	40,86 ± 0,21	40,74 ± 0,22	40,65 ± 0,27	40,49±0,23	40,30 ± 0,25
(%)		3,71 ± 0,41	-0,10 ± 0,11	-0,49 ± 0,10	-0,77 ± 0,22	-1,00 ± 0,18**	-1,39 ± 0,17**	-1,85 ± 0,15**
Composición A de filirina/filigenina								
1,3 mg/kg	39,56 ± 0,21	41,13 ± 0,47###	41,94 ± 0,49	41,52 ± 0,42	41,36 ± 0,33	41,13 ± 0,46	40,94 ± 0,33	40,61 ± 0,31
(%)		3,99 ± 0,52	-0,46 ± 0,18	-0,90 ± 0,12	-1,29 ± 0,27** $\Delta\Delta\Delta$	-1,83 ± 0,34**	-2,30 ± 0,46*** $\Delta\Delta\Delta$	-3,08 ± 0,25*** $\Delta\Delta\Delta$
2,6 mg/kg	39,72 ± 0,29	41,23 ± 0,35###	40,88 ± 0,32	40,43 ± 0,38	40,21 ± 0,23	39,94 ± 0,25	39,73 ± 0,26	39,35 ± 0,22
(%)		3,79 ± 0,46	-0,85 ± 0,02	-1,09 ± 0,03** $\Delta\Delta\Delta$	-1,65 ± 0,19** $\Delta\Delta\Delta$	-2,30 ± 0,44*** $\Delta\Delta\Delta$	-2,82 ± 0,22*** $\Delta\Delta\Delta$	-3,75 ± 0,31*** $\Delta\Delta\Delta$
5,2 mg/kg	39,77 ± 0,30	41,17 ± 0,23###	40,75 ± 0,26	40,03 ± 0,21	39,85±0,22	39,58±0,27	39,32 ± 0,23	38,99 ± 0,25
(%)		3,51 ± 0,41	-1,02 ± 0,15** $\Delta\Delta\Delta$	-1,77 ± 0,12** $\Delta\Delta\Delta$	-2,21 ± 0,27*** $\Delta\Delta\Delta$	-2,93 ± 0,14*** $\Delta\Delta\Delta$	-3,50 ± 0,12*** $\Delta\Delta\Delta$	-4,33 ± 0,11*** $\Delta\Delta\Delta$
Composición B de filirina/filigenina								
1,3 mg/kg	39,56±0,32	41,15 ± 0,39###	39,44±0,46	39,85 ± 0,36	39,94 ± 0,35	38,95 ± 0,49	38,76 ± 0,29	39,25 ± 0,20
(%)		4,02 ± 0,44	-0,29±0,10	-0,73 ± 0,20	-0,95 ± 0,29** $\Delta\Delta\Delta$	-1,53 ± 0,30**	-2,02 ± 0,30*** $\Delta\Delta\Delta$	-0,78 ± 0,41*** $\Delta\Delta\Delta$

(continuación)

Grupos	Normal	1 h después de inducción de fiebre	Temperatura corporal (°C)					
			Tiempo después de la administración (min)					
			30	60	90	120	180	240
Composición B de filirina/filigenina								
2,6 mg/kg	39,72 ± 0,25	41,24 ± 0,40###	39,50 ± 0,38	39,40 ± 0,31	39,20 ± 0,32	38,92 ± 0,29	38,71 ± 0,12	38,48 ± 0,32
(%)		3,83 ± 0,41	-0,55 ± 0,17	-0,81 ± 0,09**Δ▲	-1,30 ± 0,20**Δ▲	-2,01 ± 0,44**Δ▲	-2,54 ± 0,37**Δ▲	-3,11 ± 0,24***Δ▲
5,2 mg/kg	39,77 ± 0,33	41,16 ± 0,21###	39,40 ± 0,19	39,16 ± 0,34	38,97 ± 0,24	38,75 ± 0,25	38,54 ± 0,26	38,19 ± 0,11
(%)		3,51 ± 0,32	-0,94 ± 0,23**Δ▲	-1,52 ± 0,20**Δ▲	-2,00 ± 0,21***Δ▲	-2,56 ± 0,20***Δ▲	-3,10 ± 0,18***Δ▲	-3,97 ± 0,09***Δ▲
Cuando se compara con el grupo de control del modelo, *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001; cuando se compara con el grupo normal (antes de la inducción de fiebre), ###p <0,001.								
Cuando se comparó el porcentaje de antipirético de la composición de filirina/filigenina con el de la filirina, Δp <0,05; ΔΔp <0,01, Cuando se comparó el porcentaje de antipirético de la composición de filirina/filigenina con el de la filigenina, ▲p <0,05; ▲▲p <0,01.								

TABLA 2-9. Efectos inhibidores de las composiciones de filirina/ filigenina sobre la hinchazón de la pata de la rata inducida por carragenina ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Grupos	Porcentaje de hinchazón (%)							
	15 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min	360 min
Grupo de control	18,7±12,6	28,9±14,6	33,8±10,5	46,5±18,2	46,7±15,3	48,8±21,9	49,1±14,6	47,4±15,5
Aspirina 100 mg/kg	8,90±6,70*	15,6±12,2*	20,3±10,9*	21,6±12,1**	26,1±21,1**	26,1±16,3**	34,9±14,6*	31,9±12,2*
Filirina 10,0 mg/kg	12,9 ±8,41	19,9±9,55	21,8±11,8*	28,9±14,0*	30,8±15,4*	29,9±11,1*	33,5±10,0*	32,2±11,9*
Filigenina 10,0mg/kg	14,9 ±6,13	21,9±9,72	27,1±13,5	30,7±10,2*	33,8±12,1*	31,0±11,3*	35,8±13,5*	36,4±10,2
Composición A de filirina/filigenina								
2,5 mg/kg	13,6 ±8,40	24,2±16,3	20,1±14,8**	22,0±16,0**	26,8±16,1**	26,8±23,3**	29,5±16,1**	32,4±23,4**
5,0 mg/kg	11,4 ±8,90	15,2±6,20*	18,0±9,00*	19,7±12,1**	22,0±14,9**	24,2±12,0**	27,8±13,1**	30,0±16,0**
10,0 mg/kg	9,0 ±7,90*	13,2±9,50*	15,8±11,6**	17,9±14,3**	19,7±15,2**	22,5±11,8**	25,4±10,6**	28,7±11,4**
Composición B de filirina/filigenina								
2,5 mg/kg	13,5 ±8,52	24,9±16,0	21,1±14,1*	23,1±16,5**	27,4±15,6**	27,7±23,7**	30,4±16,9**	33,1±22,8**
5,0 mg/kg	12,4 ±8,71	16,0±6,15*	19,5±9,55*	20,2±11,6**	23,2±15,2**	25,6±11,6**	28,89±12,7**	31,6±15,5**
10,0 mg/kg	9,9 ±7,80*	13,9±9,61*	16,9±12,2**	18,2±14,8**	20,5±15,9**	23,8±12,0**	26,1±11,3**	29,8±11,9**

Cuando se compara con el grupo de control, *p <0,05; **p <0,01;
cuando se comparó el porcentaje de antipirético de la composición de filirina/filigenina con el de la filirina, Δp <0,05; ΔΔp <0,01; cuando se comparó el porcentaje de antipirético de la composición de filirina/filigenina con el de la filigenina, ▲p <0,05; ▲▲p <0,01.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en el alivio o/y tratamiento de una enfermedad viral, en la que la composición farmacéutica consiste en filirina, filigenina y un vehículo farmacéuticamente aceptable y la proporción de filirina a filigenina en partes en peso es 80-98:2-20.
- 10 2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad viral es causada por un virus seleccionado del grupo que consiste en virus de influenza, virus de parainfluenza, virus Cocksackie CoxA16, virus sincitial respiratorio, virus del herpes zoster simple HSV-I, virus del herpes zoster simple HSV-II, virus del herpes zoster simple CVB3, adenovirus y enterovirus EV71.
- 15 3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proporción de filirina a filigenina en partes en peso es 90-98:2-10.
- 20 4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proporción entre el peso total de filirina y filigenina en la composición farmacéutica con respecto al peso del vehículo farmacéuticamente aceptable es de 1:1 a 1:100.
5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es ciclodextrina.
6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina.
- 25 7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica existe en una forma seleccionada del grupo que consiste en un comprimido, cápsula, píldora, polvo, gránulo, jarabe, solución, emulsión, inyección, atomizador, aerosol, gel, crema, cataplasma, emplasto de goma y parche.