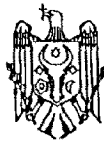




MD 4898 C1 2025.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4898** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A61K 9/08* (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 33/40 (2006.01)
C11D 3/48 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2019 0018 (22) Data depozit: 2017.03.29 (31) Nr.: 16 52697 (32) Data: 2016.03.29 (33) Țara: FR (41) Data publicării cererii: 2019.08.31, BOPI nr. 8/2019	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2024.08.31, BOPI nr. 8/2024 (85) 2019.02.27 (86) PCT/IB2017/051797, 2017.03.29 (87) WO 2017/168344 A1, 2017.10.05
(71) Solicitant: OXYMO TECHNOLOGIES INC., CA (72) Inventatori: WILMOTTE Rémi, FR; LORENZO Frédéric, FR; CHRETIEN Denis Olivier, FR (73) Titular: OXYMO TECHNOLOGIES INC., CA (74) Mandatar autorizat: GLAZUNOV Nicolae	

(54) Compoziție, în particular o compoziție farmaceutică preventivă și curativă
pe bază de peroxometalat

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un amestec sau o compoziție, de preferință terapeutic activă administrată topic, care conține cel puțin o sare a unui metal, unde metalul este selectat dintre molibden (Mo), wolfram (W), vanadiu (V), aur (Au), o lantanidă, în particular lantan; cel puțin un agent de chelare; cel puțin o sursă de radicali de peroxidare; cel puțin un agent tampon; precum și la compoziții farmaceutice, formate din acest amestec sau conținându-l, metode de producere și aplicare a acestuia, și anume pentru o metodă de tratament terapeutic a unei infecții virale, în particular implicând un virus din familia *Herpesviridae*, sau ca un antiinflamator.

Revendicări: 29

Figuri: 8

MD 4898 C1 2025.03.31

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

Prezenta invenție se referă la un amestec activ într-un tratament terapeutic, amestecul menționat conținând un peroxometalat, precum de exemplu un peroxomolibdat și/sau, ca de exemplu un peroxolantanat.

În particular, prezenta invenție se referă la un amestec activ pentru tratamentul preventiv și curativ al infecțiilor cu *Herpesviridae* și în particular, al infecțiilor cu *Herpes simplex* 1 (HSV-1 sau HHV-1) și cu *Herpes simplex* 2 (HSV-2 sau HHV-2). Prezenta invenție de asemenea se referă la compoziții farmaceutice conținând un astfel de amestec activ, la metodele de preparare precum și la utilizările sale, în particular cu scopul unui tratament terapeutic.

Stadiul anterior

Printre patologiile infecțioase, cele datorate virusilor, în plus la gravitatea lor variabilă în funcție de tipul lor, care pot conduce chiar la moartea pacientului, și cu o rată a morbidității foarte inegală în funcție de populație și de vremuri, prezintă o problemă terapeutică majoră. Acest agent cauzal necesită o celulă gazdă metabolismul și constituenții căreia îi folosește pentru multiplicare, de unde dificultatea iradierii prin tratamentul respectiv al țesutului sănătos în raport cu unul infectat, sau chiar un tratament preventiv.

Printre infecțiile virale care pot afecta oamenii, cele cu *Herpesviridae* sunt curente, extrem de contagioase și endemice. Această familie de virusi cu ADN constă din opt tipuri de virusi. Printre aceștia, HHV-1 sau HSV-1 și HHV-2 sau HSV-2 sunt responsabili pentru herpes orofacial-labial și vaginal-anal.

Toți virusii de herpes, prezintă proteinele clinice și proprietățile structurale ale genomului precum latența, recurența sau activarea litică. Ca și în cazul tuturor infecțiilor virale, mijloacele terapeutice sunt complexe și frecvent limitate. Invenția este destinată să soluționeze problema tehnică ce constă în furnizarea unei compoziții farmaceutice oferind posibilitatea de a acționa împotriva unei infecții virale, în special a unei infecții virale implicând *Herpesviridae* și în particular HSV-1 și HSV-2.

Infecțiile cu HSV-1 și HSV-2 sunt foarte contagioase (în special prin contact) și endemice (Organizația Mondială a Sănătății (OMS), Ianuarie 2016, "The herpes viruses", memorandum No. 400, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/fr/#>). Sursa este omul, fără nicio zoonoză sau orice vector. Prevalența infecțiilor HSV-1 responsabile pentru herpesul orofacial-labial, pentru anumite forme de herpes genital și a paronichiei herpetice, este variabilă în funcție de continente, metode și posibilități de diagnostic. Ea este estimată să fie în medie de la 84 la 99% în Africa, de la 50 la 100% în Asia, de la 65 la 98% în Europa și de la 57 la 68% în America de Nord. Prevalența infecțiilor cu HSV-2, responsabile pentru herpesul genital și anal, este variabilă în funcție de gen, profilul etnic și sociologic, vârsta și continent. De exemplu (Centrul pentru prevenirea și controlul deceselor (CCD). MMWR Morb Mortal Wkly Rep., no 59(15), 2010, p. 456-459), seroprevalența în Statele Unite pentru intervalul de vârstă de la 40 la 49 de ani este estimată să fie 32% la femei și 20% la bărbați.

Luând în considerare rata de morbiditate, infecțiile HSV-1 și HSV-2 au un anumit impact social mondial. Într-adevăr, niciun tratament curativ total eficient nu există în ceea ce privește eradicările, dacă administrarea medicamentelor antivirale este per os sau pe cale parenterală, dacă aceasta este un analog pirofosfat (foscarnet, de exemplu), analogi nucleozidelor neactivabile sau activabile *in situ* (precum fiacitabin, vidarabin, aciclovir și promedicamentul lor valaciclovir, de exemplu) sau a unui inhibitor al complexului enzimatic helicaz-primazic (pritelivir). Ei contribuie la reducerea seriozității și frecvenței simptomelor, dar nu iradiază infecția. Cel mai des, conform solubilității joase a acestor molecule și în particular cele ale familiei «ciclovir» (1,3 mg/mL în apă la 25°C pentru aciclovir) precum și a absorbției lor intestinale limitate (este de ordinul 20% pentru aciclovir *per os*), doze consecutive trebuie să fie administrate la pacienți.

Spre deosebire de medicamentele topice oftalmice, substanțele anti-HSV folosite în dermatologie (precum ciclofovir, ibacitabin, aciclovir, de exemplu) au eficiență clinică care rămâne modestă și nu constantă.

În plus, formele achiziționate de rezistențe la virusi de *Herpes simplex* la tratamente convenționale *per os* sau pe cale parenterală sunt descrise în creștere. Ele sunt cele mai des conectate la mutațiile genomului viral [1] (Bisa fost S. et al., Antiviral Res., vol. 80(1), 2008, p. 81-85).

În plus la dimensiunile infectării, durerii și aspectului inestetic recurent al pacientului pe durata reactivării virale, aceste infecții pot deveni complicate prin patologii serioase și complexe deși

rămân destul de rare, precum encefalita herpetică sau cheratita. Contaminarea neonatală maternală poate fi 60% mortală în absența tratamentului. Infecțiile herpetice și dezvoltarea lor poate fi asociată cu alte patologii din cauza imunodepresiei, de fapt, (fie indusă sau patologică) sau imunosupresiei pacientului precum de exemplu, în cazul unor cancere sau după o greafă. HSV-2 este parte din cele mai frecvente infecții (de la 60 la 90%) printre persoanele purtătoare HIV. Riscul contactului unei infecții noi HIV este înmulțit la trei în prezența unei infecții HSV-2. Purtătorii ambelor infecții au un risc mai înalt de transmitere a HIV-ului.

Din acest motiv obiectul invenției este să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei metode de prepararea a unei astfel de compoziții farmaceutice.

Obiectul invenției este de asemenea să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice active care este topic acceptabilă.

Obiectul invenției este de asemenea să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice active care este ușor solubilă în solvenți hidrofilici.

Obiectul invenției este în plus să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice active pe durata pasaj trans-epidermal.

Obiectul invenției este în plus să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice care este dezactivată pe durata pasajului trans-cutanat.

Obiectul invenției este în plus să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice, biofaza căreia este bine delimitată și atinsă.

Obiectul invenției este în plus să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice pentru care biodisponibilitatea este minimă.

Obiectul invenției este în plus să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice active având un efect anti-replicant asupra unui virus, și în particular asupra HSV.

Obiectul invenției este în plus să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice active având citotoxicitate înaltă pentru celulele infectate cu un virus, și în particular cu HSV.

Obiectul invenției este în plus să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice active având citotoxicitate mică pentru celulele sănătoase.

Obiectul invenției este în plus să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice active care are o eficiența profilactică și în particular pentru HSV.

Obiectul invenției este în plus să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice active care are o eficiența profilactică în special pe durata fazei prodromice a infecției și în particular pentru HSV.

Obiectul invenției este în plus să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice active care are eficiența profilactică în special prin scurtarea fazei acute și în particular pentru HSV.

Obiectul invenției este în plus să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice active care poate preveni sau limita procesul infecțios și în particular cel al HSV.

Obiectul invenției este în plus să rezolve problema tehnică ce constă în oferirea unei compoziții farmaceutice active având stabilitate bună pe durata păstrării sale la temperatura camerei și până la 45°C.

Descrierea invenției

Inventatorii au descoperit, că a fost posibil să rezolve problemele tehnice menționate mai sus prin oferirea unei compoziții sau unui amestec terapeutic activ pentru cale topică, conținând cel puțin o sare a unui metal, metalul fiind selectat dintre moliбden (Mo), wolfram (W), vanadiu (V), aur (Au), lantanidă, în particular lantan; cel puțin un agent de chelare; cel puțin o sursă de radicali de peroxidare; cel puțin un agent tampon;

unde compoziția sau amestecul are un potențial redox de la 250 la 550 milivolți; sau un potențial redox de la 300 la 450 milivolți și chiar mai de preferință de la 300 la 420 milivolți.

Prin „farmaceutic activ” se subînțelege faptul că amestecul sau compoziția au o activitate benefică cu scopul unui tratament terapeutic.

Termenul de „amestec” se referă la o compoziție și nu limitează compoziția pe care o desemnează la un preparat particular sau metodă de preparare. Termenul de „amestec” aici oferă posibilitatea de a distinge mai ușor din punct de vedere semantic „amestecul” de „compoziție” în particular când de exemplu „amestecul” este integrat într-o «compoziție» care include alți ingrediente.

Invenția mai exact se referă conform unui prim aspect, la o compoziție sau amestec, de preferință terapeutic activ printr-o cale topică, conținând:

- cel puțin o sare a unui metal, metalul fiind selectat dintre molibden (Mo), volfram (W), vanadiu (V), aur (Au), o lantanidă, în particular lantan;
 - cel puțin un agent de chelare;
 - cel puțin o sursă de radicali de peroxidare;
 - cel puțin un agent tampon,
- unde amestecul sau compoziția specificată are un potențial redox de la 250 la 550 milivolți.
- Invenția se referă în mod avantajos la o compoziție sau amestec, de preferință terapeutic activ prin calea topică, conținând:
- cel puțin o sare a unui metal, metalul fiind ales dintre molibden (Mo), volfram (W), vanadiu (V), aur (Au), o lantanidă, în particular lantan;
 - cel puțin un agent de chelare;
 - cel puțin o sursă de radicali de peroxidare;
 - cel puțin un agent tampon;
 - amestecul menționat sau compoziția de preferință având un potențial redox de 250 la 550 milivolți, și de preferință 300 la 450 milivolți și din nou de preferință 300 la 420 milivolți.
- Amestecul conform prezentei invenții oferă avantajos posibilitatea de a forma un medicament, și mai exact un medicament stabil și activ *in situ*.
- Amestecul conform prezentei invenții constă într-un echilibru al compusului menționat mai sus, formând avantajos un complex peroxometalic inclusiv sărurile sale. Conform inventatorilor, fără a avea intenția de a fi legat de teorie, amestecul conform prezentei invenții oferă posibilitatea de a forma o structură supermoleculară de tip zăbrele într-un echilibru stabil nepermanent, care oferă posibilitatea de promovare la nivelul extracelular și *in situ* a unui catalizator pentru reacții precum Fenton și Haber-Weiss. Aceste reacții se spune că sunt „precum” când ele au loc din cauza metalului din amestecul din invenție sau din cauza altui metal care nu este fierul. O porție de substanță reactivă generată extemporaneu prin substanța activă ce penetrează celula, și mai avantajos celula infectată.
- Conform unei variante compoziția include mai multe săruri de metale, metalul fiind ales dintre molibden (Mo), volfram (W), vanadiu (V), aur (Au), o lantanidă, în particular lantan.
- În funcție de metoda de producere, sarea metalului este o sare a molibdenului sau conținând molibden.
- Conform unei metode de producere, sarea metalului este sarea lantanidei sau conținând o lantanidă.
- Conform unei metode de producere, sarea metalului este un amestec a unei sări a molibdenului și a unei sări a lantanidei.
- Invenția se referă în mod avantajos la o compoziție sau amestec, de preferință terapeutic activă prin calea topică, conținând:
- cel puțin o sare de molibden (Mo), opțional în combinație cu cel puțin o sare a unui metal ales dintre volfram (W), vanadiu (V), aur (Au), o lantanidă, în particular lantan;
 - cel puțin un agent de chelare;
 - cel puțin o sursă de radicali peroxidanți;
 - cel puțin un agent tampon;
 - amestecul menționat sau compoziția de preferință având un potențial redox de 250 la 550 milivolți, și de preferință 300 la 450 milivolți și din nou de preferință 300 la 420 milivolți.
- De preferință, sarea metalului este prezentă ca oxid(oxizi) sau peroxid(peroxizi) într-un amestec. Avantajos, oxizii metalici a amestecului din invenție oferă posibilitatea de a forma un intermediar care este un metal acid, și mai exact un acid Lewis.
- Conform unei alternative, este preferat un compus metalic pentru care gradul de oxidare a metalului este compatibil cu reacția «precum» Fenton-Haber-Weiss și Fenton-Haber-Weiss (o reacție de oxido-reducere care implică alți ioni metalici precum fierul, care, în cazul nostru, este într-un context de chelare) metastabil, adică, în special metale de tranziție și în particular Mo(VI), W(IV) la (VI), V(III) la (V), Au(I) la (III).
- Conform unei alternative, un compus lantanic este preferat care poate forma un oxid hexavalent de tip LnO_3 , pentru care gradul de oxidare este compatibil cu metastabilul Fenton-Haber-Weiss și Fenton-Haber-Weiss «precum» și în particular La(III), Ce(III) și (IV), Nd(III) și (IV), Sm(III) și (IV), Gd(IV).
- Avantajos, metalul din metalat este de valență maximă.
- Avantajos, metalul este oxidat până la gradul său maxim de oxidare.
- Conform unei alternative preferate, sarea metalului include molibden. Prin urmare, conform unei alternative, sarea metalului este o sare a molibdenului sau conținând molibden. Mai exact, amestecul conform prezentei invenții de preferință include molibdat de sodiu. Conform invenției,

utilizarea unei sări ai molibdenului este preferată, în care valența molibdenului este de ordinul VI. Această sare oferă avantajos posibilitatea de oferire a stabilității semnificative amestecului din compoziție. În plus, molibdenul, în special ca o sare și de exemplu ca o sare de sodiu, cu valență sa reactivă (VI), electronegativitatea sa compatibilă, citotoxicitatea sa foarte joasă, posibilitatea sa de reacție Fenton-Haber-Weiss reacție care poate fi „precum”, este în particular preferată.

Conform unei alternative, sarea metalului formată include un peroxometalat, și mai exact care poate fi găsită ca o formă intermediară hidro-peroxometalat.

Avantajos, sarea molibdenului este de preferință o unitate peroxo sau hidropoxo. Încă în mod avantajos, substanța activă este de tipul MoO_4^{2-} sau forma sa hidropoxo (Oyerinde Oyeyemi F. et al., Solution structure of molybdic acid from Raman spectroscopy and DFT analysis, Inorganica Chimica Acta 361, 2008, p. 1000–1007. Doi:10.1016/j.ica.2007.06.025), de exemplu, un complex intermediar cu formula de tipul $\text{Na}_4[\text{Mo}_2\text{O}_6(\text{chelare})] \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ într-un amestec din invenție.

Conform unei alternative, metalul este sarea lantanidei sau conținând o lantanidă.

Conform unei alternative, sarea metalului formată include un peroxolantanat, și mai exact care poate fi din nou găsit în forma unui intermediar hidro-peroxolantanat. De exemplu, el poate fi din nou găsit ca un intermediar complex cu o formulă de tip $\text{NaLn}(\text{chelare}) \cdot x\text{H}_2\text{O}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ (cu x și y care depinde de tipul lantanidei (Ln) folosite într-un amestec din invenție).

Avantajos, sarea molibdenului și lantanidei, și mai exact lantan, este de preferință o unitate peroxo sau hidropoxo (Suponitskiy, Y.L., Proshina, O.P., Dyunin, A.G. et al. Thermodynamic properties of lanthanum Molybdates, Russ. J. Phys. Chem. 2016, vol. 90, p. 267. Required: 10.1134/S00360244160202031X).

Avantajos, utilizarea unei sări ai molibdenului oferă posibilitatea de a limita citotoxicitatea amestecului conform invenției, în particular asupra corpurilor roșii și limfocitelor, epiteliului, fibroblastelor, osteoblastelor.

Un avantaj al utilizării molibdenului reiese din prezența sa naturală ca factori enzimatici (precum de exemplu xantin oxidaza, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza cu feredoxin, etc.).

Avantajos, utilizarea sării de lantan oferă posibilitatea de a limita citotoxicitatea amestecului conform invenției.

Conform unei alternative preferate, metalul în forma sa de substanță activă joacă un rol a unui catalizator pentru producerea substanțelor reactive $\text{HO}_2^\bullet$, și opțional $\text{HO}^\bullet$ și $\text{O}_2^\bullet$.

Conform unei alternative, amestecul conform invenției include de la 0.1 la 500 μM , și de preferință de la 1 la 200 μM , și încă de preferință de la 5 la 150 μM de sare a metalului.

Conform unei alternative, amestecul conform invenției include de la 0,1 la 100 μM , și de preferință de la 1 la 50 μM , și în plus de preferință de la 5 la 30 μM de sare metalică a molibdenului.

Conform unei alternative, amestecul conform invenției include de la 0,1 la 100 μM , și de preferință de la 1 la 50 μM , și în plus de preferință de la 5 la 30 μM sare metalică a lantanului.

Termenii «agenți de chelare» (sau „chelatani”) corespund la compușii chimici capabili de a forma un complex coordinativ stabil cu unul sau câțiva ioni și mai exact cu formele ionice ale metalului prezent în compoziție. Metalul poate fi prezent în orice formă inclusiv într-o formă peroxidat sau hidropoxidat. Acest complex se spune că este un „chelat”.

Agenții de chelare pot fi potriviți pentru amestec conform prezentei invenții avantajos ar putea cataliza extracelular, producere *in situ* a radicalilor reactivi $\text{HO}_2^\bullet$ pe de o parte; în special dar de asemenea $\text{O}_2^\bullet$ și $\text{OH}^\bullet$ și permit chelarea ionilor de calciu și metalici inclusiv ionilor de fier (Fe(II) sau Fe^{2+}) și ioni fierici (Fe(III) sau Fe^{3+}) care sunt extracelulari, legați sau liberi. Eliberarea acestor reagenți este cu atât mai eficientă cu cât afinitatea chelaților pentru ionii extracelulari Ca^{2+} și $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ este semnificativă. Acești chelați sunt compuși stabili prezenți în amestecul farmaceutic activ din invenție și participă în plus la producerea preferențială a radicalului $\text{HO}_2^\bullet$, în activitatea farmaceutică sau terapeutică a amestecului conform prezentei invenții, în special prin chelarea preferențială *in situ* a ionilor de calciu și fier. Aceasta chelare *in situ* ar de asemenea permite reglarea la un nivel extracelular al influxurilor celulare de calciu, în particular indus de infecția virală pe de o parte, precum de exemplu prin *Herpesviridae*, și prin stresul oxidativ datorită prezenței radicalilor sau peroxo compușilor din altă parte.

Avantajos, agenții de chelare nu penetrează celula și rămân extracelulari.

Conform unei alternative preferate, agenții de chelare stabilizează complexii peroxo și hidro-peroxomolibdat conținuți în formulare. Asemenea peroxo- și hidro-peroxomolibdați pot fi de tip $(\text{Mo}_2\text{O}_6)^{4+}$ și $[\text{Mo}_4\text{O}_{12}(\text{O}_2)_2]^{4+}$.

Avantajos, conform unei alternative, agentul de chelare permite stabilizarea prin chelare a substanței active ion MoO_4^{2-} , care în forma sa sodică are o masă moleculară de 205,937 g *per* mol sau peroxomolibdat (de exemplu în formă de $\text{MoO}_3\text{-BAPTAH22-}$ și/sau $\text{MoO}_3\text{-EGTAH22-}$).

Conform unei alternative, compoziția sau amestecul conform invenției include cel puțin doi agenți de chelare.

Avantajos, agentul(agenții) de chelare leagă prin coordonare metalatul oxidat sau peroxidat în soluție.

5 Conform unei alternative, agentul de chelare formează un complex cu metalatul oxidat sau peroxidat pentru a forma un dimer intermediar complex $[\text{Mo}_2\text{O}_6(\text{chelatat})]^{4+} \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ și/sau al formei peroxotetramolibdat(VI) $[\text{Mo}_4\text{O}_{12}(\text{O}_2)_2]^{4+}$ -chelatat, apoi sarea metalului este o sare de molibden.

Conform unei alternative, agentul de chelare formează un complex cu metalatul oxidat sau peroxidat pentru a forma un complex $[\text{W}_2\text{O}_6(\text{chelatat})]^{4+} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, unde sarea metalului este o sare a volframului.

10 Conform unei alternative, agentul de chelare formează un complex cu un lantanat oxidat sau peroxidat cu scopul de a forma în special un complex $[\text{La}(\text{O}_2)\text{-Chelatat}]^{2+} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ unde sarea de lantanidă este o sare a lantanului.

Avantajos, agentul de chelare este compatibil cu captarea sterică a complexelor oxidați și/sau peroxidați din metalat. Mai exact, mărimea «buzunarului» său N---N care separă resturile carboxilice implicate în coordonare precum și pliarea sterică a catenei carbonice în acest buzunar care ar trebui

15 avantajos să fie compatibil cu capturarea complexelor metalici intermediari, în special într-o formă oxidată peroxidată. Avantajos, agentul de chelare este compatibil cu sarcinile electronice din metalat și cu structura orbitalilor săi atomici externi.

20 Conform unui aspect, agentul(agenții) de chelare sunt selectați din poliacizii organici și sărurile acestora, în special acizi amino-carboxilici. Tipic, acizi amino-carboxilici includ unul sau câțiva atomi de azot ai unei funcții amino de preferință o amină secundară sau terțiară legată de cel puțin două grupe ale acizilor carboxilici, prin atomi, în general carbon și opțional atomi de oxigen.

Conform unei alternative, agentul(agenții) de chelare are(au) cel puțin trei grupe de coordonare, de preferință grupe ale acizilor carboxilici, la trei capete ale moleculei(moleculelor) formând agentul(agenții) de chelare, grupele de coordonare menționate fiind separate printr-o catenă din cel puțin trei atomi inclusiv cel puțin un atom de azot.

25 Avantajos, agentul(agenții) de chelare are(au) cinci grupe de coordonare, de preferință grupe ale acizilor carboxilici, la cinci capete ale moleculei(moleculelor) formând agentul(agenții) de chelare, grupele de coordonare menționate fiind separate printr-o catenă din cel puțin șase atomi și de preferință nouă atomi, inclusiv un atom de azot și de preferință doi atomi de azot separați prin cel puțin doi atomi.

Conform unei alternative, agentul(agenții) de chelare are(au) patru grupe de coordonare, de preferință grupe ale acizilor carboxilici, la patru capete ale moleculei(moleculelor) formând agentul(agenții) de chelare, grupele de coordonare menționate fiind separate printr-o catenă din cel puțin șase atomi și de preferință doisprezece atomi, inclusiv doi atomi de azot separați prin cel puțin opt atomi.

35 Conform unei alternative, atomii ce separă grupele de coordonare menționate și/sau atomii de azot ai agentului(agenților) de chelare sunt selectat dintre atomii de carbon, azot și de oxigen. Unii atomi ce separă grupele de coordonare menționate și/sau atomii de azot ai agentului(agenților) de chelare pot fi incluși în unul sau câteva inele atomice identice sau diferite, precum de exemplu inele nearomatice, aromatice sau heteroaromatice, de exemplu un fenil sau un piridil.

Avantajos, agentul de chelare este selectat dintre BAPTA (acid 1,2-bis(o-aminofenoxi)etan-N,N,N',N'-tetraacetic), EGTA: (acid etilen glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacetic), DTPA (acid dietilentriaminopentaacetic), și orice amestecuri ai acestora.

45 Conform unei alternative, agentul de chelare este selectat dintre BAPTA, EGTA și orice amestecuri ai acestora.

Avantajos, BAPTA și/sau EGTA permit o stabilitate mai bună a precursorilor precum și un randament de sinteză mai bun.

50 pKas-ul a patru grupe carboxil ale BAPTA sunt: pK1 și pK2 <4 (BAPTA insolubil), pK3 = 5,47, și pK4 = 6,36; și a EGTA sunt: pK1 = 2,00, pK2 = 2,65, pK3 = 8,85, și pK4 = 9,46.

Avantajos, pKas-le agentului(agenților) de chelare sunt compatibile cu pH-ul soluției din invenție.

55 Avantajos, pKas-le agentului(agenților) de chelare sunt compatibile cu pKa-ul metalului acid sau metal peracid intermediar format în soluția din invenție.

Avantajos, pKas-le agentului(agenților) de chelare sunt compatibile cu pH-ul regiunilor infectate, precum de exemplu a epitelului.

Avantajos, agentul(agenții) de chelare selectați sunt puțin citotoxici. Acest lucru este în mod special notabil în cazul BAPTA și EGTA.

Sarea metalului și agenții de chelare sunt prezenți într-o cantitate și raport suficient pentru producerea complexelor {peroxo-metalat – chelare} agentul(agenții)}.

De preferință, cel puțin unul din agenții de chelare prezent are o afinitate mai mare pentru calciu decât pentru metalul folosit într-un amestec din invenție. Aceasta oferă avantajos posibilitatea substituției complexelor de chelare a amestecului din invenție cu un agent de chelare-calcium complex *in vivo*. Avantajos, concentrația chelatului(chelaților) este compatibilă cu concentrația Ca^{2+} extracelular (2-3mM într-o plasmă umană), adică agentul(agenții) de chelare prezenți într-un amestec din invenție sunt în cantități suficiente pentru formarea eficientă a unui complex din punct de vedere terapeutic cu cantitatea prezentă de calciu extracelular.

Avantajos, chelatul(chelații) prezenți au mai mare afinitate pentru fier ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) decât pentru metalele folosite într-un amestec din invenție. Aceasta avantajos permite substituția complexelor de chelare a amestecului din invenție cu un agent de chelare- $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ complex, *in vivo*.

Conform unei alternative, amestecul conform invenției include de la 0,0001 la 1 mM agenți de chelare.

Conform unei alternative, amestecul conform invenției include de la 0,1 la 100 μM , și de preferință de la 1 la 50 μM , și încă de preferință de la 5 la 20 μM BAPTA. Conform unei variante, amestecul conform invenției include de la 1 la 80 μM , și de preferință de la 20 la 80 μM BAPTA.

Conform altei alternative, amestecul din invenție include de la 0,1 la 1 mM, și de preferință de la 50 la 800 μM , și încă de preferință de la 200 la 700 μM of EGTA. Conform unei variante, amestecul din invenție include 200 la 2,000 μM , și de preferință 600 la 1,400 μM EGTA.

Conform altei alternative, amestecul din invenție include BAPTA și EGTA prezenți într-o concentrație de la 0,0001 la 1 mM, și de preferință de la 5 la 20 μM și de la 200 la 700 μM , respectiv.

Conform unei alternative, sarea molibdenului și agenții de chelare sunt prezenți conform unui raport de la 10/1 la 1/100 (raport: Mo sare/agent de chelare, exprimată în concentrații molare).

Conform unei alternative, sarea de lantan și agenții de chelare sunt prezenți conform unui raport de la 10/1 la 1/100 (raport: Mo sare/agent de chelare, exprimată în concentrații molare).

Conform unei alternative, sarea molibdenului și BAPTA sunt prezenți conform unui raport de la 3/1 la 1/10, exprimat în concentrații molare.

Conform unei alternative, sarea molibdenului și EGTA sunt prezenți conform unui raport de la 1/10 la 1/70, exprimat în concentrații molare.

Conform unei alternative, sarea de lantan și BAPTA sunt prezenți conform unui raport de la 3/1 la 1/10, exprimat în concentrații molare.

Conform unei alternative, sarea de lantan și EGTA sunt prezenți conform unui raport de la 1/10 la 1/70, exprimat în concentrații molare.

Conform unei alternative, sursa de radicali este în special H_2O_2 .

Conform unei alternative, una sau câteva surse secundare de radicali pot fi adăugate sau sintetizate în minoritate *in situ*.

Conform unei alternative, H_2O_2 este o soluție apoasă conținând H_2O_2 la 110 volume sau 30% sau 8,82M.

Avantajos, sursa de H_2O_2 nu include nici un agent de stabilizare selectat dintre: acizi piridin-carboxilici, precum de exemplu acid picolinic; acizi fosfonici și amino fosfonici; amide sau amine substituie; acizi alchil sulfonici; și amestecuri ale acestora.

Conform unei alternative, sursa principală de radicali de peroxidaze este peroxidul de hidrogen. Prin urmare, conform acestei alternative, sursa principală de radicali de peroxidaze este prezentă la o concentrație variind de la 200 la 600 mM, de preferință de la 300 la 500 mM, și în plus de preferință de la 340 la 450 mM.

Conform unei alternative, amestecul conform invenției include o proporție de peroxid de hidrogen variind de la 30 mM la 4,4 M, și de preferință de la 150 mM la 3 M, și de preferință de la 235 mM la 1,8 M, și încă de preferință de la 260 mM la 440 mM. Conform unei alternative, amestecul din invenție nu include nici un fel de adiție extemporană de peracid.

Avantajos, cantitatea (sau concentrația) de peroxid de hidrogen (H_2O_2) este testată prin titrare. Tipic, este posibilă utilizarea unei testări prin intermediul soluției de permanganat de potasiu.

Concentrația peroxidului de hidrogen poate de asemenea fi testată prin spectroscopie UV.

Avantajos, un agent de tamponare este folosit pentru controlul specific al pH-ului amestecului conform invenției.

Avantajos, un agent tampon este folosit cu scopul controlului specific al pH-ului pe durata aplicării *in situ* a soluției conform invenției.

Dintre agenții de tamponare, un acid carboxilic este preferat.

De preferință, agentul de tamponare nu include următorii acizi: acizi carboxilici hidroxilați (de ex., acid malic) sau acizi policarboxilici (de ex., acizi citrici și isocitrici, acid malonic); acizi carboxilici cu o greutate moleculară mai mare decât 100 g/mol și în particular acizi carboxilici cu catenă lungă (mai mare decât C₆) din cauza destabilizărilor membranei celulare pe care le pot induce, precum și acizi carboxilici alifatici nesaturați (acid sorbic, de exemplu) din cauza posibilității lor de peroxidare de tip alchenoic care este citotoxic.

Conform unei alternative, prezenta invenție include prezența anumitor acizi generați *in situ* pe durata sintezei, de preferință într-o cantitate mică (precum de exemplu acidul peracetic). Ei sunt folosiți ca o sursă accesorie de radicali la producerea invenției și utilizarea terapeutică a invenției.

Conform unei alternative, un agent tampon având pKa la pH-ul fiziologic (piele și mucoase), adică un pH de exemplu inclus între 4,4 și 5,0 și compatibil cu pKa a acidului metalic oxidat și/sau peroxidat, forma căreia este ionizată (pentru ex. MoO₄H₂, pK₁ = 3,61 și pK₂ = 3,89) este preferat.

De preferință, agentul de tamponare este prezent într-un amestec din invenție la o concentrație inclusă între 1 și 500 mM, și de preferință între 10 și 200 mM, încă de preferință între 50 și 100 mM.

Raportul concentrațiilor molare ale peroxidului de hidrogen și agentului de tamponare este inclus între 2 și 9 și de preferință între 3 și 8.

Avantajos, amestecul este tamponat pentru a obține un pH de la 4,4 la 5,0 care este compatibil i) pentru un contact al invenției cu membranele pielii și mucoasei, ii) stabilitatea substanței active MoO₄²⁻ în prezența H₂O₂, iii) reacția catalitică Fenton-Haber-Weiss fie «precum» sau nu, și, iv) producerea *in situ* a speciilor de radicali în special de tipul HOO•.

Conform unei alternative, compoziția sau amestecul include un agent tampon permițând un pH de la 4,0 la 5,2, de preferință de la 4,4 la 5,0, de exemplu un acid carboxilic, și de preferință acid acetic.

Avantajos, compoziția sau amestecul are un potențial redox de la 350 la 420 mV.

Eficiența redox a amestecului din invenție poate de asemenea fi estimată prin oxidarea *in vitro* a quercitinei prin ioni de fier(III) sau Fe³⁺. Este deosebit de posibil să se folosească pentru aceasta așa-numita metodă de testare «metoda quercitinei», (adaptată de exemplu de la studiile lui El Hajji H. et al. Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation. Free Radic. Res., 2006, vol. 40(3), p. 303-320 and Balcerzak M. et al. Selective determination of Fe(III) in Fe(II) samples by UV-spectrophotometry with the aid of quercetin and morin, Acta Pharm., 2008, vol. 58, p. 327-334).

Prezenta invenție de asemenea se referă la o metodă de preparare a unui amestec sau a unei compoziții precum este definit conform prezentei invenții. Mai exact, prezenta invenție se referă la o metodă de preparare a unui amestec sau a unei compoziții conform invenției care include (i) prepararea unei soluții tampon (ST) conținând un agent tampon având un pH acid, (ii) prepararea unei soluții a unui complex metalic (SC) conținând sarea unui oxid metalic, (iii) prepararea unei prime soluții inițiale (Si1) conținând peroxid de hidrogen, (iv) prepararea unei soluții inițiale secundare (Si2) prin amestecarea soluției ST cu soluția Si1, (v) prepararea unei soluții (S1) conținând un compus peroxo-metalic prin amestecarea soluției SC cu soluția Si2, (vi) prepararea unei soluții S2 prin ajustarea pH-ului soluției S1 cu o bază, pH-ul soluției S2 fiind mai bazic decât pH-ul unei soluției ST, (vii) adăugarea la soluția S2 a unui sau a câtorva agenți de chelare, (viii) optional ajustarea pH-ului, (ix) ajustarea optională a volumului soluției finale, obținerea unui amestec sau a unei compoziții precum este definit conform invenției.

În funcție de o variantă, când două sau mai multe săruri de oxid metalic sunt folosite, cu diferiți oxizi metalici, prepararea unei soluții a unui complex metalic (SC) poate consta în pregătirea unor soluții separate pentru fiecare sare de oxid metalic și apoi amestecarea acestor soluții simultan sau succesiv cu soluția Si2 pentru a prepara o soluție S1.

De preferință, prepararea amestecului conform prezentei invenții este realizată conform unei metode de sinteză catalitică. Sinteza catalitică a amestecului conform invenției este tipic secvențială. Avantajos, metodă din invenție include secvența de ETAPE (iii) => (iv) => (v) => (vi) => (vii) => (viii) => (ix).

Avantajos, metoda de preparare este urmată de analiza spectrală (de exemplu prin analiza spectrului IR, UV și/sau vizibil) a unei sau a mai multor etape de preparare, și de preferință pe parcursul tuturor etapelor de preparare.

Conform unei alternative, prima soluție inițială Si1 are un prim potențial redox mai mare decât potențialul redox al amestecului conform invenției.

De preferință, ulterior pasului (ix), unde nu este o diluare a volumului amestecului pentru evitarea deplasării echilibrului chimic a amestecului conform prezentei invenții.

Desigur, este avantajos să se utilizeze substanțe sau compuși cu o puritate suficient de satisfăcătoare ca materie primă. În mod deosebit, este necesar ca diferitele substanțe sau compuși să aibă compatibilitate cu utilizarea terapeutică.

Conform unei alternative, este posibil să se folosească IR-FT, și/sau spectrometrie de masă RMN-H a amestecului produs conform invenției cu scopul de a fi siguri de conformitatea compoziției amestecului cu cerințele industriale, și în special pentru utilizarea farmaceutică terapeutică. De asemenea, de preferință se efectuează o spectrometrie IR-FT asupra componentelor precursore ale amestecului conform invenției.

Conform unei alternative, pH-ului poate fi controlat la una sau câteva, sau chiar în toate etapele de preparare.

Conform unei alternative, potențialul redox poate fi controlat la una sau câteva, sau chiar în toate etapele de preparare.

Conform unei alternative, amestecul invenției poate fi controlat prin densitometrie și/sau spectrofotometrie UV, la una sau câteva, sau chiar în toate etapele de preparare.

Conform unei alternative, este posibilă testarea eficiența redox a amestecului din invenție prin intermediul metodei quercitinei (analiza spectrofotometrică UV a oxidării *in vitro* a quercitinei prin Fe^{3+} prezent sau produs *in vitro*).

Avantajos, peroxidul de hidrogen este prezent în soluția Si1 la o concentrație variind de la 200 la 600 mM, de preferință de la 300 la 500 mM, și de preferință de la 330 la 460 mM.

Conform unui exemplu de realizare, materialul folosit este metal și este de preferință în oțel inoxidabil, opțional metal pasivat.

Conform unui exemplu de realizare, materialul poate fi re-pasivizat după prepararea amestecului conform invenției, de exemplu prin punerea materialului (care va fi în contact cu amestecul sau cu precursorii acestuia) în contact cu o soluție de peroxid de hidrogen.

Este de preferat să se efectueze o analiză a sursei de peroxid de hidrogen pentru a se asigura cantitatea de peroxid de hidrogen prezent și a se alocă în prepararea amestecului conform invenției. Această analiză poate fi efectuată, de exemplu, prin titrare sau prin spectrofotometrie UV (în general la 240 nm).

Avantajos, pH-ul soluției tampon ST este de la 4,4 la 5,0, și de preferință de la 4,7 la 4,8.

Avantajos, agentul tampon a soluției ST este un tampon acid carboxilic/carboxilat și soluția ST are un raport peroxid de hidrogen/carboxilat cuprins între 20/1 și 1/1, și de preferință de aproximativ 5/1.

Avantajos, raportul dintre acidul acetic (AcOH) și sarea sa adăugată în cantitate limitată, permite obținerea celei mai mici producții de acid peracetic (AcOOH). Avantajos, într-o metodă de preparare conform invenției, producția de acid peracetic este minimă și influența catalitică a acestuia este foarte mică.

Prepararea primei soluții initiale Si1 include prepararea unei soluții apoase de acid carboxilic, și de preferință a acidului acetic și apoi adăugarea peroxidului de hidrogen.

De preferință, prima soluție inițială Si1 are un pH de la 2,5 la 4,6, și de preferință de la 2,7 la 4,2. Avantajos, prima soluție inițială Si1 are un potențial redox de la 400 la 550 mV, și de preferință de la 420 la 500 mV.

Avantajos, metoda include o măsurare a potențialului redox în etapele (iii) la (ix), și de preferință de asemenea include o măsurare a pH-ului în etapele (iii) la (ix).

Conform unei alternative, a doua soluție inițială Si2 are un pH de la 2,5 la 3,2, și de preferință de aproximativ 2,9. Conform unei alternative, soluția inițială Si2 are un potențial redox mai mare decât potențialul redox al primei soluții initiale Si1. Potențialul redox al celei de a doua soluții initiale Si2 poate fi de la 420 la 570 mV, și de preferință de la 440 la 520 mV.

Conform unei alternative, soluția tampon ST este introdusă în prima soluție inițială Si1.

Conform unui exemplu de realizare, concentrația de peroxid de hidrogen în a doua soluție inițială Si2 variază de la 300 la 500 mM, și de preferință de la 260 la 440 mM.

Avantajos, în etapa (iv), pH-ul este menținut mai jos de limita admisibilă a pH-ului reacției de sinteză catalitică pentru amestec conform invenției. Un agent tampon este avantajos folosit în etapa (iv).

Avantajos, în etapa (iv) producerea generată *in situ* de acid peracetic este minimă.

Avantajos, în etapa (iv) potențialul redox al soluției Si1 a etapei (iii) este crescut, de exemplu prin trecerea valorii de la 440 la 460 mV la o valoare de 460 la 480 mV în etapa (iv).

Prin monitorizarea concentrației peroxidului de hidrogen prezent pe durata preparării amestecului din invenție, producerea peroxidului este observată pe durata introducerii acestuia, adică punerea peroxidului de hidrogen în contact cu soluția tampon (etapa (iv)). Avantajos, adăugarea de

peroxid de hidrogen este realizată într-o soluție apoasă tamponată preventiv la un pH acid. Prin urmare, pentru prepararea primei soluții inițiale S1, peroxidul de hidrogen este adăugat într-o soluție cu un pH acid, și de exemplu cu un pH de la 2,7 la 4,2.

5 Avantajos, etapa (iv) duce la deplasarea echilibrului către producerea *in situ* a H_2O_2 cu distrugerea acidului peracetic eventual generat de echilibrul chimic.

Conform unei alternative, soluția tampon SC este introdusă în soluția S1.

Conform unei alternative, soluția S1 conținând un complex peroxometalic are un pH de la 2,5 la 3,5, și de preferință de la 2,8 la 3,0.

10 Conform unui exemplu de realizare, potențialul redox al soluției S1 conținând un complex peroxometalic variază de la 400 la 550 mV, și de preferință de la 440 la 500 mV.

Conform unui exemplu de realizare, concentrația peroxidului de hidrogen în soluția S1 conținând un complex peroxometalic variază de la 250 la 500 mM, și de preferință de la 320 la 450 mM.

15 În etapa (v), sarea molibdat adăugată este în forma de acid molibdenic $MoO_3 \cdot H_2O$ și $MoO_3 \cdot 2H_2O$.

În condiții non-inventive, sinteza la echilibrul substanței active MoO_4^{2-} , la temperatura camerei, fără nici un catalizator și fără adăugarea oricărui acid puternic (H_2SO_4 , de exemplu) ar necesita mai multe zile.

20 Conform unui exemplu de realizare, pH-ul soluției S2 este tamponat la o valoare cuprinsă, de preferință inclusă între 4,4 și 5,0, și de exemplu de la 4,5 la 5,0. Avantajos, la acest pH tamponat, este forma instabilă MoO_4^{2-} cea care predomina (starea de oxidare Mo(VI)) și peroxidul de hidrogen este stabilizat. Peroxidul de hidrogen este adesea stabilizat industrial printr-un tampon fosfat. Se poate forma un compus intermediar instabil de fosfomolibdat (galben) care dispare la echilibru, făcând H_2O_2 mai reactiv.

25 Conform unei alternative, potențialul redox al soluției S2 variază de la 300 la 450 mV, și de preferință de la 360 la 410 mV.

30 Oxizii de molibden Mo(VI) într-o soluție apoasă și la pH pentru sintetiza amestecului conform invenției pot exista sub structuri moleculare diferite: MoO_4^{2-} și $[MoO_6^{2-}]$, $[Mo_2O_3(O_2)_4(H_2O)_2]^{2-}$, dar și în formele polinucleare reactive (cum ar fi structurile complexe binucleare oxo-Mo(VI) (Dement'ev I.A. et al. Mononuclear, polynuclear, and cluster complexes of molybdenum and their reactions as models of biochemical systems and processes. Russ. J. Gen. Chem., 2007, vol. 77(5), p. 822-843).

35 Avantajos, condițiile de preparare permit formarea *in situ* a peroxo- și hidro-polioxomolibdatului când sarea de metal utilizată este o sare de molibden. Acestea din urmă fac parte din: tipul $[Mo_2O_3(O_2)_4(H_2O)_2]^{2-}$. Conform unei alternative, un exces molar de peroxid de hidrogen de mai mult de 1000 de ori și de sare de metal și în particular de mai mult de 10,000 de ori și încă preferabil de 15,000 de ori, relativ la Mo(VI) este preferat.

40 Avantajos, agentul(agenții) de chelatare, precum și pH-ul de sinteză limitează deplasările reacției tipului „reducător Jones” constând în reducerea ionului metalat, avantajos adică molibdat, într-o stare de oxidare scăzută corespunzătoare molibdenului metalic. Conform unei alternative, această deplasare este limitată într-un mediu apos ușor acid, în mod tipic cu un pH cuprins între 4,4 și 5,0, și de exemplu de la 4,5 la 4,7.

De preferință, apoi câțiva agenți de chelare sunt prezenți, se prepară soluții independente de agenți de chelare, fiecare soluție cuprinzând un agent de chelare specific.

45 Conform unei alternative preferate, adăugarea agenților de chelare este realizată cu o ordine de creștere a pKas.

De exemplu este posibil să se prepare o soluție cuprinzând un agent de chelare de tip BAPTA pe de o parte și o soluție de agent de chelare de tip EGTA pe de altă parte. Preferabil se adaugă BAPTA și apoi EGTA.

50 Avantajos, agentul(ții) de chelare oferă posibilitatea *in situ*, adică după aplicarea topică, în special reacția Fenton-Haber-Weiss, cu o constantă de disociere remarcabilă $K_{dchelate}: Fe^{2+}/Fe^{3+} > Ca^{2+}$.

Avantajos, agentul(agenții) de chelare permit posibilități extracelulare *in situ*, auto-susținerea producției radicale reactive $HOO\bullet$ în principal și în minoritate $O_2\bullet$ și $HO\bullet$.

55 Conform unei alternative, este mai întâi posibil să se adauge BAPTA la soluția S2 pentru a obține o soluție S3 rezultată. Soluția S3 are, de exemplu, un pH cuprins între 4,0 și 5,0 și preferabil între 4,3 și 4,8. De exemplu, soluția S3 are un potențial redox identic cu cel al soluției S2. Cu alte cuvinte, potențialul redox nu variază după adăugarea agentului de chelare de tip BAPTA. Conform unei alternative, potențialul redox al soluției S3 variază de la 250 la 450 mV și, de preferință, de la

300 la 400 mV. Avantajos, dizolvarea preliminară a BAPTA într-un volum mic de soluție S2 este realizată înainte de punerea ei în contact cu restul soluției S2.

De preferință, concentrația BAPTA este într-un raport molar de la 1/1 la 1/3 și de preferință 1/2, relativ la sarea de molibden.

5 De exemplu, soluția S3 are o concentrație de peroxid de hidrogen de la 250 la 500 mM și de preferință de la 320 până la 440 mM.

Avantajos, este posibil să se adauge cel puțin un alt agent de chelare de tip EGTA în soluția S3 pentru a obține o soluție rezultată S4. Conform unei alternative, soluția S4 are un pH care variază de la 4,0 la 5,0 și preferabil de la 4,3 până la 4,7. Conform unei alternative, potențialul redox al soluției variază de la 300 la 400 mV și de preferință de la 350 la 390 mV.

10 De preferință, concentrația EGTA este într-un raport molar de la 10/1 la 50/1 și de preferință de aproximativ 25/1, relativ la sarea de molibden.

De exemplu, soluția S4 are o concentrație de peroxid de hidrogen de la 250 la 550 mM și de preferință de la 320 până la 470 mM.

15 Conform unei alternative, pH-ul din etapa (viii) este ajustat cu o soluție bazică, de exemplu de tip hidroxid de sodiu, preferabil concentrat, de exemplu la o concentrație de la 8 la 15 M. Avantajos, pH-ul din etapa (viii) poate fi ajustat la o valoare de la 4,4 până la 5,0 și de preferință de aproximativ 4,6.

20 Conform unei alternative, pH-ul amestecului conform invenției este cuprins între 4,50 la 4,70. Avantajos, potențialul redox al amestecului conform invenției variază de la 320 la 390 mV.

Conform unei alternative preferate, metoda cuprinde o reducere a potențialului redox în etapa (vi). O reducere a potențialului redox poate de exemplu fi de la 50 la 150 mV, și tipic de aproximativ 90 mV.

25 De preferință, potențialul redox este în mod substanțial constant după reducerea potențialului redox al etapei (vi).

Avantajos, amestecul conform prezentei invenții este stabil pe decursul depozitării, de exemplu la temperatura camerei sau până la o temperatură de 45°C timp de șase luni. Se recomandă menținerea amestecului în întuneric și la distanță de umiditate.

30 pH-ul este măsurat cu ajutorul unui pH-metru calibrat și compensat la temperatură, cu un electrod combinat KCl 4M/AgCl.

Potențialul redox este măsurat cu un pH-metru combinat de pH/redox, echipat cu un electrod Platină/calomel calibrat. În mod tipic, această măsurare este efectuată la temperatura camerei, adică 20°C și la presiunea ambiantă, adică 101325 Pa.

35 Concentrația de peroxid de hidrogen este de preferat evaluată în soluțiile menționate mai sus prin spectroscopie UV conform ecuației derivate din legea Beer-Lambert: $A_{240nm} = 43,6 \times l \times [H_2O_2]$ cu l în centimetri și $[H_2O_2]$ în moli (Noble R.W. et al. The reaction of ferrous horseradish peroxidase with hydrogen peroxide. J. Biol. Chem., 1970, vol. 245(9), p. 2409-2413).

Conform unei alternative specifice, compusul peroxo-metalic al soluției S1 este un compus peroxo-molibdenic.

40 Amestecul conform invenției cuprinde, prin urmare, în conformitate cu această alternativă un compus peroxometal. Conform unei alternative preferate, amestecul conform invenției cuprinde un complex peroxo-molibdenic.

45 Conform unei alternative, soluția conține molibdat de sodiu în forma Mo(VI). Avantajos, pentru pH-ul soluțiilor conform invenției, sarea este în principal în formă catalitică MoO_3 -BAPTA³⁻ în special și MoO_3 -EGTA³⁻ în special, ambele surse ale substanței active MoO_4^{2-} .

Conform unei variante de realizare particulare, amestecul conform invenției cuprinde o sare, de preferință sodiu, de molibden, un amestec din doi agenți de chelare, de preferință de tip BAPTA și EGTA, peroxid de hidrogen și un agent de tamponare acetat (acid acetic/acetat de sodiu, de exemplu).

50 Conform unei alternative specifice, amestecul conform prezentei invenții include:

- Sare de molibdat, și de exemplu molibdat de sodiu;
- BAPTA;
- EGTA;
- H_2O_2 ;
- CH_3COOH/CH_3COONa ;

55 - Eredox de la 250 la 550 mV, și de preferință de la 300 la 450 mV, și din nou de preferință de la 300 la 420mV;

- pH 4,4 - 5,0.

Conform unei variante specifice, amestecul conform prezentei invenții include:

- Sare de molibdat, și de exemplu molibdat de sodiu;

- Sare de lantan, și de exemplu nitrat de lantan;
 - BAPTA;
 - EGTA;
 - H₂O₂;
 - CH₃COOH/CH₃COONa;
 - E_{redox} de la 250 la 550 mV, și de preferință de la 300 la 450 mV, și din nou de preferință de la 300 la 420 mV;
 - pH 4,4 - 5,0.
- Avantajos, compușii din amestec sunt în cantități necesare și condiții pH și condiții de potențial redox pentru formarea unui complex peroxomolibdat sau complex hidroperoxomolibdat în care molibdenul are valența VI.
- Conform unui exemplu de realizare particular, amestecul conform invenției cuprinde cel puțin un agent de chelare și în cel mai bun caz și cel puțin doi agenți de chelare și, de preferință, la o concentrație de la 5 la 20 μM și 200 la 700 μM, respectiv.
- Conform unui exemplu de realizare particular, amestecul din invenție include 340 mM la 450 mM din principalul donator radical ca H₂O₂.
- Invenția se referă în special la o compoziție farmaceutică pentru uz extern, conform invenției ca un amestec sau a compoziție terapeutic activă, respectiva compoziție sau amestec cuprinzând cel puțin o sare a unui metal, metalul fiind selectat dintre molibden (Mo), wolfram (W), vanadiu (V), aur (Au), o lantanidă, în particular lantan; cel puțin un agent de chelare; cel puțin un agent tampon și o sursă de radicali peroxidare, unde amestecul sau compoziția specificată are un potențial redox de la 250 la 550 milivolți. O astfel de compoziție conform invenției este utilă într-o metodă de tratament terapeutic.
- Invenția se referă, de asemenea, la o metodă de tratament terapeutic conținând administrarea, mai avantajos prin aplicare topică, la un subiect ce are nevoie de o cantitate terapeutic eficientă a unei compoziții farmaceutice conținând cel puțin o sare a unui metal, metalul fiind selectat dintre molibden (Mo), wolfram (W), vanadiu (V), aur (Au), o lantanidă, în particular lantan; cel puțin un agent de chelare; cel puțin un agent tampon și o sursă de radicali peroxidanți, unde compoziția are un potențial redox de la 250 până la 550 milivolți.
- Invenția se referă, de asemenea, la un procedeu pentru prepararea unei compoziții farmaceutice conform invenției pentru utilizare într-o metodă de tratament terapeutic.
- Invenția în particular se referă la compoziții farmaceutice conținând sau ce constă dintr-un amestec conform invenției.
- Invenția se referă astfel la o compoziție farmaceutică pentru utilizare locală, caracterizată prin aceea că ea cuprinde un amestec terapeutic activ, așa cum este definit conform invenției sau care poate fi obținut conform unei metode definite în conformitate cu invenția.
- În mod avantajos, compoziția farmaceutică pentru uz extern conform invenției cuprinde de la 0,001 până la 5 mM, de preferință de la 0,01 până la 2 mM și încă preferabil de la 0,02 la 1 mM de un amestec farmaceutic activ.
- Invenția se referă în special la o compoziție farmaceutică pentru uz extern, conform invenției, pentru utilizarea sa într-o metodă de tratament terapeutic a unei infecții virale, și în particular implicând un virus din familia *Herpesviridae*.
- Invenția se referă în special la o compoziție farmaceutică conform invenției pentru utilizarea ei într-o metodă de tratament terapeutic a unei infecții implicând HSV-1 și/sau HSV-2.
- Invenția se referă în special la o compoziție farmaceutică conform invenției pentru utilizarea ei într-o metodă de tratament terapeutic antiinflamator.
- Invenția se referă în special la o compoziție farmaceutică conform invenției, pentru utilizarea ei într-o metodă de tratament terapeutic preventiv sau curativ.
- Invenția se referă, de asemenea, la o compoziție farmaceutică, având un potențial redox de la 250 până la 550 milivolți și conținând molibden, cel puțin un agent de chelare, cel puțin un agent tampon și o sursă de radicali de peroxidare pentru utilizarea ei într-o metodă de tratament terapeutic al herpesului.
- Termenul „conform invenției” face referire la oricare dintre exemplele de realizare, alternative, avantaje, preferințe sau exemple ale invenției, luate singure sau în conformitate cu oricare dintre combinațiile lor.
- În mod tipic, compozițiile farmaceutice pentru uz topic conform invenției conțin excipienți și în special excipienți aprobați pentru farmacopee.
- Prin tratament terapeutic antiinfecțios se înțelege atât un tratament terapeutic preventiv, un tratament profilactic și un tratament curativ, care dă posibilitatea de a limita, de exemplu, infecția în

cazul contactului contaminant, apariția unei boli, faza acută cu, fie parțial eradicarea sau nu a agentului cauzal și/sau limitarea diseminării sale.

În mod avantajos, amestecul activ sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții este activă *in situ* în timpul aplicării sale.

5 În mod avantajos, amestecul activ sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții este activ în timpul trecerii trans-epiteliale și, de preferință, nu permite sau numai într-un mod limitat trecerea transcutanată.

Avantajos, amestecul activ sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții este dezactivată în timpul trecerii transcutanate.

10 Conform unei alternative, amestecul conform invenției sau o compoziție care îl conține este aplicată pe cale topică la nivelul orofacial.

Conform unei alternative, amestecul conform invenției sau o compoziție care îl conține este aplicată pe cale topică la nivel genital sau anal.

15 Conform unei alternative, amestecul conform invenției sau o compoziție care îl conține se aplică pe cale topică pe piele.

Conform unei alternative, amestecul conform invenției sau o compoziție care o conține este aplicată pe cale topică pe o mucoasă.

20 Conform unei alternative, excipienți aprobați de Farmacopeea Europeană (Ph. Eur.), Farmacopeea Națională (USP, JP, IP, Ph. Helv., Ph.Belg., Ph Fr., BP, DAB, OAB, în special) și Farmacopeea Internațională (Ph. Int.; WHO), pot fi introduși în timpul fabricării invenției și/sau în „amestecul” menționat ca „Amestec 1”.

Amestecurile și compozițiile conform invenției sunt în mod special adecvate pentru activitatea farmaceutică la ființele umane.

25 Avantajos, amestecul activ al invenției dă posibilitatea de a aplica reacții de tip Fenton-Haber-Weiss și precum cele de tip Fenton-Haber-Weiss și de a genera preferențial radicalul $\text{HO}_2\bullet$ și în minoritate radicalii $\text{O}_2\bullet$, $\text{HO}\bullet$.

Conform inventatorilor, permearea substanței reactive $\text{HOO}\bullet$, este suficientă pentru a induce într-o manieră limitată și controlată apoptoza celulelor.

30 Conform inventatorilor, permeația substanței reactive $\text{HOO}\bullet$, este suficientă pentru a avea într-un mod eficient și controlat un efect anti-replicare viral.

Conform invenției, potențialul redox al amestecului conform invenției este de preferință utilizat pentru limitarea într-un domeniu restrâns a concentrațiilor precursorilor substanțelor active radicale astfel încât să genereze un echilibru de sunet între: un efect anti-replicare/citotoxicitate moderată pentru celulă sănătoasă/citotoxicitate semnificativă pentru celula infectată/efect de prevenire a infecției.

35 Avantajos, amestecul terapeutic sau farmaceutic activ, conform invenției, dă posibilitatea producerii, în principal și preferențial, a speciilor radicale reactive $\text{HOO}\bullet$.

40 Prin urmare, conform prezentei invenții, calciul extracelular *in vivo* este principalul factor de declanșare a producerii de $\text{HOO}\bullet$. De exemplu, aceasta este în principal o acțiune la complex $2\text{Mo}_{(\text{VI})}\text{-BAPTA}_2(\text{H}_2\text{O}_2)$ când sarea de molibden și BAPTA sunt introduse în amestecul din invenție. De exemplu, aceasta este în principal o acțiune la complexul $2\text{Mo}_{(\text{VI})}\text{-EGTA}_2(\text{H}_2\text{O}_2)$ când sarea de molibden și EGTA sunt puse în joc în amestecul conform invenției.

45 Avantajos, producerea în mediu extracelular a $\text{HOO}\bullet$ permite modificări extracelulare (de exemplu, oxidarea reziduurilor de aminoacizi extra-membranare) care pot limita astfel infecția virală prin modificarea recunoașterii celulare.

50 Avantajos, producerea în mediul extracelular a $\text{HOO}\bullet$ precum și permeația sa celulară sunt compatibile cu durata lungă de viață (≥ 1 s) și cu penetrarea mare a celulei în raport cu $\text{OH}\bullet$ sau $\text{O}_2\bullet$ (1 ms și penetrarea de ordinul 1 nm). Avantajos, această substanță $\text{HOO}\bullet$ este implicată în reacția Haber-Weiss și reacția Fenton („precum” sau nu) la nivelul extracelular și intracelular și permite auto-susținerea acesteia din urmă.

Avantajos, amestecul care conține Mo (IV) conform prezentei invenții are un pH de la 4,4 până la 5,0. Acest lucru permite în special optimizarea constantei ratei kobs ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) de descompunere $\text{HO}_2\bullet/\text{O}_2\bullet$.

55 Avantajos, modificarea potențialului redox intracelular prin contactarea cu compoziția conform invenției permite un echilibru apoptotic/anti-apoptotic. Mai exact, acest echilibru apoptotic/antiapoptotic depinde în mod deosebit de existența unei infecții cu HSV și în principal de HSV-1 și -2.

Conform unei alternative, amestecul conform invenției este selectiv activ asupra celulele infectate cu HSV și în principal de HSV-1 și -2.

Astfel, există un echilibru apropiat între căile stresului indus de infecția cu HSV, incluzând influxul de calciu și reglarea apoptozei.

Acest echilibru este perturbat de prezența radicalilor intra-citoplasm și de modificările potențialului redox celular. Acesta induce aceleași căi celulare de stres ca o infecție cu HSV, aceleași influxuri de calciu și aceleași inducții ale căilor metabolice, aceleași căi fiind reglate înapoi spre un alt echilibru antiapoptotic. Acesta susține efectul terapeutic al amestecului conform invenției sau al compozițiilor care îl compun.

Conform unei alternative, compoziția farmaceutică sau amestecul conform invenției este utilizată într-o metodă terapeutică de tratament pentru herpesul labial și orofacial.

Conform unei alternative, compoziția farmaceutică sau amestecul conform invenției este utilizată într-o metodă terapeutică de tratament a herpesului genital și anal.

Conform unui exemplu de realizare, amestecul activ conform invenției are o eficiență antiinfecțioasă (acțiune directă moderată până la scăzută asupra virusului, receptorii virali la celulă ca posibili candidați), anti-recunoaștere și internalizare (acțiune semnificativă, receptorii celulei la virus). Aceste eficiențe sunt externe celulei și limitează infecțiozitatea virale. Astfel, amestecul activ conform invenției are o acțiune profilactică. Astfel, din nou, amestecul activ conform invenției are o eficiență antiinfecțioasă.

Conform unei alternative, compoziția farmaceutică sau amestecul conform invenției este utilizată într-un tratament terapeutic al unei populații care exprimă HSV său pliat, replicativ sau infecțios.

Conform unei alternative, compoziția farmaceutică conform invenției sau amestecul este utilizat într-un tratament terapeutic al unei populații celulare sau al unui țesut care prezintă HSV-1 (Kessler H.H. et al. Detection of Herpes Simplex Virus DNA by real-time PCR. J. Clin. Microbiol., 2000, vol. 38(7), p. 2638-2642).

Conform unei alternative, compoziția farmaceutică sau amestecul conform invenției este utilizat într-un tratament terapeutic al unei populații celulare sau al unui țesut care prezintă HSV-2 (Kessler H.H. et al. Detection of Herpes Simplex Virus DNA by real-time PCR. J. Clin. Microbiol., 2000, vol. 38(7), p. 2638-2642).

Avantajos, amestecul activ conform invenției are o eficacitate anti-replicare indusă de faptul că există un contact preliminar cu infecția cu o celulă sau țesut sănătoasă. Amestecul activ conform invenției poate fi utilizat pentru prevenirea unei infecții prin limitarea replicării virale intracelulare și / sau prin limitarea penetrării virusului în celulă.

Avantajos, amestecul activ conform invenției are o eficiență pre-anti-replicare asupra metabolismului celular al celulei infectate (căi de stres oxidativ și canale de calciu). Amestecul activ conform invenției poate fi utilizat în mod specific pentru a acționa direct împotriva replicării virale intracelulare și împotriva unei infectări a celulelor cu HSV-1 și/sau HSV-2 ale aceluiași țesut infectat sau a unui țesut sănătos apropiat de cel precedent.

Conform unei alternative, amestecul activ conform invenției induce în mod eterogen o inhibare a producției de interleukină-6 (IL-6) a unui fragment cutanat uman și are astfel o eficiență antiinflamatorie.

În figuri:

Fig. 1 - reprezintă variațiile potențialului redox și ale concentrației de H_2O_2 în timpul preparării Amestecului 1.

Fig. 2 - ilustrează un calcul Fe^{3+} utilizat pentru analiza eficienței redox a Amestecului 1.

Fig. 3 - este o ilustrare a eficienței redox a Amestecului 1 la diferite concentrații ale acestuia (absorbanta quercetinei de către $Fe(III)$ într-un mediu plasmatic uman după contact (2 minute) cu Amestecul 1 (în $nM MoO_4^{2-}$).

Fig. 4 - ilustrează un calcul al eficienței redox a Amestecului 1 la diferite concentrații ale acestuia din urmă

Fig. 5 - ilustrează influența Amestecului 1 la o concentrație diferită de MoO_4^{2-} asupra producerii *in situ* în plasmă umană a Fe^{3+} , i) care rezultă din complexul transferin- Fe^{3+} după contactarea cu formularea, ii) asupra echilibrului Fe^{2+}/Fe^{3+} și iii) asupra oxidării quercetinei.

Fig. 6 - ilustrează producția de interleukină-6 (IL-6) în supernatantele culturii biopsiilor neopatologice ale pielii umane (2 minute) stimulate de Amestecul 1 (24,3 pM de substanță activă) sau NaCl (100 mM) ca control. (D1-5: donatorul 1 până la 5, B1 sau 2: biopsia 1 sau 2).

Fig. 7 - ilustrează media producției la 6 ore și 24 ore după contactul cu interleucina-6 (IL-6) în supernatantele de cultură ale biopsiei cutanate umane stimulate non-patologic (2 min.) prin Amestecul 1 (24,3 μM de substanță activă) sau NaCl (100 mM) drept control.

Fig. 8 - este o reprezentare a eficienței redox a Amestecului 1 și a Amestecului 2 la concentrații diferite (absorbția quercetinei de către Fe(III) în plasmă umană după contactul (2 min.) cu Amestecul 1 (în nM MoO_4^{2-}) sau cu amestecul 2 în (în nM $\text{La}(\text{MoO}_4)^{1-}$).

5

Exemple**Exemplul 1** - Exemplul unui amestec activ conform invenției

Exemplul prezent este realizat cu o sare de molibden. O compoziție cu o formulă conform tabelului 1 (“Amestec 1”), exprimată în concentrația inițială a constituienților este preparată:

Tabelul 1

Compoziții	Amestec conform invenției
Molibdat de sodiu	20,7 μM
BAPTA	12,6 μM
EGTA	526 μM
H_2O_2	353 mM
$\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$	70 mM
Ph (cu NaOH)	4,4 - 5,0
E_{redox}	300 la 420 Mv

10

Compoziția se spune că este o compoziție „inițială” deoarece ea corespunde la concentrațiile reagenților adăugați fără a lua în considerare procesul catalitic aplicat.

Toți constituienții folosiți pentru sinteză precum și produsele finale sunt confirmate prin spectrele lor IR-FT.

15

Tabelul 1a

Produs	Puritate	Formulă brută	CAS No.
Molibdat de sodiu dihidrat	98-103%	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10102-40-6
BAPTA: acid (1,2-bis(o-aminofenoxi)etan- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic)	$\geq 98\%$	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	85233-19-8
EGTA: acid (etilen glicol-bis(2-aminoetileter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic)	$\geq 99\%$	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	67-42-5
Peroxid de hidrogen	29-31%	H_2O_2	722-84-1
Acid acetic glacial	99,8-100,5%	CH_3COOH	64-19-7
Acetat de sodiu trihidrat	99-101%	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5010524
Hidroxid de sodiu	10N	NaOH	1310-73-2
Apă demineralizată	1 μS	H_2O	7732-18-5

Figurile măsurărilor realizate pe durata și după sinteză sunt mediile a trei repetări.

Cantitățile indicate mai jos sunt pentru prepararea unui litru de Amestec 1.

20

A – ETAPA (i): pregătirea soluției tampon (soluția ST)

CH_3COOH (100%; d: 1,05 g. cm^{-3} (lichid, 20°C)) 4,0 ml (final 70 mM)

$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (100%) 8 g (final 59 mM)

Apă qsp 1L

Verificarea pH-ului: 4,7-4,8

25

Temperatura camerei (20°C)

B – ETAPA (ii): pregătirea soluției complexului metalic (soluția SC)

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sursă de Mo(VI); 100%) 200 mg (final 2,4 mM)

Apă qsp 340 ml

30

Agitare ușoară, Temperatura camerei

C – ETAPA (iii): pregătirea soluției inițiale (Si1)

Apă 900 mL

CH_3COOH (100%) 4 mL (70 mM)

35

Adăugați foarte lent și la agitare foarte ușoară (250 rpm),

pH: 2,9 - 3,8

E_{redox} : 470 - 490 mV

și apoi,

H_2O_2 (30%) qsp pentru 1,2% final după masă și conform testelor preliminare

La 45 min:

pH: 2,70 - 2,90

5 E_{redox} : 440 - 460 mV

Prin ecuația lui Noble: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 380\text{-}410 \text{ mM}$ (Soluția Si1)

D – ETAPA (iv): pregătirea soluției initiale (Si2)

10 Introduce „Soluția ST” în soluția Si1 12 mL ($\approx 1 \text{ mM}$ acetat)

Adaugă la o agitare ușoară.

La 45 min:

pH: $\approx 2,90$

E_{redox} : 460 - 480 mV

Prin ecuația lui Noble: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 360 - 410 \text{ mM}$ (Soluția Si2)

15 **E – ETAPA (v): pregătirea soluției peroxomolibdenice S1**

Introduce „Soluția SC” în soluția Si2 10 mL

La 45 min:

pH: 2,80 - 3,00

E_{redox} : 450 - 480 mV

20 Prin ecuația lui Noble: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 370 - 400 \text{ mM}$ (Soluția S1)

F – ETAPA (vi): pregătirea soluției S2

Ajustarea pH-ului la agitare ușoară:

NaOH 9,9-10,1M 3,6 mL pentru = 0,9 L de Amestec 1

pH 4,5 - 5,0

25 La 45 min:

pH: 4,60

E_{redox} : 380 - 390 mV (Soluția S2)

G – ETAPA (vii): Adăugarea agenților de chelare – Pregătirea soluției S4

30 Introducerea BAPTA (98,8%) 6 mg/L,

după dizolvarea foarte lentă a BAPTA la agitare ușoară într-o alicotă de formulare S2 (1,4 L) echilibrată în prealabil la 25°C (așa numită soluție „S3.1”).

Unește soluția S3.1 cu soluția S2 pentru a forma soluția S3.2.

La 45 min:

pH: 4,40-4,70

35 E_{redox} : 380 - 390 mV

Prin ecuația lui Noble: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 370 - 390 \text{ mM}$

Introduce EGTA (99,1%) 200mg/L în soluția S3.2 pentru a forma soluția S4

Dizolvă la agitare ușoară.

40 La 45 min:

pH: 4,40 - 4,60

E_{redox} : 380 - 390 mV

Prin ecuația lui Noble: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 370 - 420 \text{ mM}$

H – ETAPA (viii): Ajustarea pH-ului

45 Ajustarea pH-ului (NaOH 9, 9-10,1M, adică $\approx 400 \text{ g/L}$) => pH: $4,60 \pm 0,2$

I – ETAPA (ix): ajustarea volumului soluției finale (FS)

Ajustarea volumului cu apă demineralizată qsp 1 L

La 12-18 ore:

pH: 4,50 - 4,70

50 E_{redox} : 380 - 390 mV

Prin ecuația lui Noble: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 350 - 380 \text{ mM}$

Prin titrare: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 400 - 430 \text{ mM}$

Densitatea: $\delta = 1,004 \text{ g/ml}$

55 Amestecul gata pentru uz, conform invenției, este stabil la întuneric mai mult de 6 luni la temperatura camerei sau la 45°C.

Hidro-peroxomolibdatul de sodiu este la o concentrație de $24,3 \mu\text{M}$ în amestecul final 1.

Exemplul 2 - Semnătura prin variația potențialului redox

Semnătura amestecului activ conform prezentei invenții este evaluată prin variația potențialului redox pe durata sintezei unei compoziții preparate conform Exemplului 1.

Conform Fig. 1, față de soluția inițială (≈ 470 mV; ETAPA 3), reducerea potențialului redox la ≈ 90 mV (≈ 380 mV) în ETAPA 6 (ajustarea pH-ului cu soda). Potențialul redox rămâne constant până la sfârșitul sintezei (ETAPA 9). Același lucru este valabil pe durata îmbătrânirii formulelor amestecului din invenție conform Exemplului 1 timp de 6 luni la temperatura camerei ($389 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$) și la 45°C ($389 \text{ mV} \pm 8 \text{ mV}$) la un pH de $4,56 \pm 0,40$ și $4,53 \pm 0,41$, respectiv.

Exemplul 3 – Semnătura de consum și producere a H_2O_2 – generarea echilibrului peroxo-reagentului și a potențialului redox al Amestecului 1.

Semnătura amestecului activ conform prezentei invenții este evaluată de consumul și producerea H_2O_2 pe durata sintezei unei compoziții preparate conform Exemplului 1.

Conform Fig. 1, privind concentrația inițială a H_2O_2 (353 mM ; ETAPA 3 la 10), o producție bruscă ($\approx 42 \text{ mM}$; inclusiv o fracție mică de acid peracetic) este observată din cauza adăugării H_2O_2 în soluția tampon (acid acetic/acetat). Dacă adăugarea H_2O_2 nu este realizată într-o soluție apoasă tamponată inițial cu acid (ETAPA 3; $\text{pH} = 2,84 \pm 0,1$), degradarea sa spontană și rapidă ar rezulta din cauza pH-ului prea mare (Apă) ($\text{pK}_{\text{aH}_2\text{O}_2/\text{O}_2} = 4,8$).

De la ETAPA 4 până la ETAPA 7, un consum limitat de H_2O_2 este observată ($10 \text{ mM} \pm 6 \text{ mM}$), până la stabilizarea sa la $381 \text{ mM} \pm 5 \text{ mM}$ (ETAPA 7; +BAPTA).

Adăugarea EGTA deplasează echilibrul peroxidic («precum» reacția Fenton) prin degradarea peroxidului, adică $393 \text{ mM} \pm 29 \text{ mM}$ în ETAPA 7, la $357 \text{ mM} \pm 26 \text{ mM}$ în ETAPA 9, și $365 \text{ mM} \pm 15 \text{ mM}$ în ETAPA 9 + 12 ore.

În ETAPA 6, a scădere bruscă a potențialului redox este observată (de la $463 \text{ mV} \pm 15 \text{ mV}$ la $392 \text{ mV} \pm 17 \text{ mV}$) prin ajustarea pH-ului. Adăugarea (ETAPA 7) agenților de chelare BAPTA și apoi EGTA contribuie succesiv la stabilizarea potențialului redox ($386 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$ și $383 \text{ mV} \pm 6 \text{ mV}$) prin stabilizarea echilibrului chimic.

Exemplul 4 - Testarea eficienței redox a amestecului din invenție: metode quercitine.

A – Soluțiile reactivilor

1 - Quercitina

O soluție a quercitinei dihidrat (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona dihidrat, 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavonă dihidrat; ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) la 10^{-3} mol/L este preparată în metanol.

2 - Soluție hidroclorică

Prima soluție de acid clorhidric 1 M este preparată în metanol. A doua soluție este preparată de $0,3 \text{ M}$ în metanol. Soluția reactivă este preparată prin adăugarea $343 \mu\text{l}$ soluție de 1 M la $1,357 \mu\text{l}$ la soluția de $0,3 \text{ M}$.

3 - Soluții de Fe^{3+} (calcul de referință)

O soluție de Fe^{3+} ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) la 2 mg/ml este preparată în apă HPLC. Ea este apoi diluată pentru a obține opt soluții de referință la: 20, 100, 200, 300, 400, 500, 1,000 și $1,500 \mu\text{g/ml}$. Aceste soluții sunt la final diluate de 20 de ori în plasmă umană sau în apă HPLC pentru a obține la final concentrațiile de: 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 și $75 \mu\text{g/ml}$.

4 - Soluții de Fe^{2+} (calcul de referință, controlul activității)

O soluție de Fe^{2+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) de 89 mg/ml este preparată în apă HPLC. Ea este apoi diluată pentru a obține trei soluții de referință la: 0.445, 4.45 și 44.5 mg/ml . Aceste soluții sunt la final diluate de 10 ori în apă HPLC pentru a obține la final concentrațiile de: 0, 0.0445, 0.445 și 4.45 mg/ml .

B - Testările prin metoda quercitinică

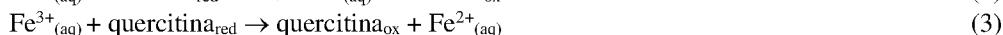
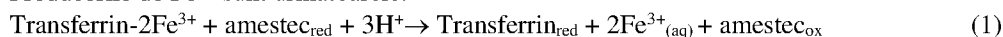
Prezența Fe^{3+} (calcul) sau producerea sa (Fe^{2+} calcul și eficiența amestecului din invenție după 2 min de contact) sunt cuantificate prin metoda quercitinică.

Conform condițiilor de analiză sau folosire a Amestecului 1:

„amestec_{ox}” se referă la un amestec conform invenției ca un oxidant.

„amestec_{red}” se referă la un amestec conform invenției ca un agent de reducere.

Producerile de Fe^{3+} sunt următoarele:



Reacția (1) este într-un mediu de plasmă.

Reacția (2) este într-un mediu de plasmă sau în apă HPLC și corespunde la echilibrul reacției Fenton-Haber-Weiss.

Reacția (3) este reacția de oxidare a quercitinei pentru evaluarea potențialului redox al Amestecului 1.

Într-un mediu acid și la 70°C, quercitina este oxidată specific de către ionul feric (Fe^{3+} ; El Hajji et al. 2006 și Balcerzak et al., 2008) născut de transferrin într-un mediu de plasmă și nu de ionul feros (Fe^{2+}). Ionul Fe^{3+} este solubil în aceste condiții.

30 μl de soluție de quercitină sunt adăugate la 170 μl soluție reactivă hidroclorică. După omogenizare, 50 μl de probă (Fe^{3+} în plasmă umană sau în apă HPLC, Fe^{2+} în apă HPLC, amestecul din invenție după 2 min de contact cu plasmă umană) sunt adăugate. Soluțiile sunt agitate intens și pe o durată scurtă și apoi incubate pentru 1 oră la 70°C. După incubare, probele sunt centrifugate pentru 15 min. la 14,000 rpm și la temperatura camerei. 100 μl de supernatante sunt eșantionate. Spectrul UV al fiecărei probe este achiziționat de la 230 la 500 nm. Blank-urile: apă, Fe^{2+} , Fe^{3+} , plasma sunt scăzute în conformitate cu tipul experimentului. Peak-ul de absorbție a quercitinei oxidate de Fe^{3+} produs de transferinul din plasmă și reacția Fenton-Haber-Weiss *in situ* este reținut (de la 285-305 nm).

Peak-ul de curbe este centrat la 292 nm apoi experimentul este realizat în apă HPLC sau în plasmă. El poate fi deplasat cu un maxim de 10 nm apoi blank-urile experimentale sunt scăzute.

1 - Fe^{3+} calcul.

Un calcul pentru ionul de Fe(III) este produs de exemplu prin măsurarea absorbției UV (în intervalul 250-330nm) a quercitinei oxidate pentru diferite concentrații ale Fe^{3+} (compar. Fe^{3+} intervalul de mai sus) în plasmă umană, și prin raportarea densității optice la lungimea de undă.

De la spectrul regiunii 250-330 nm, aria de sub curbă (AUC) între 285 și 305 nm este calculat cu formula:

$$AUC_{285nm}^{305nm} = \int_{285nm}^{305nm} f(x)dx = \int_{285nm}^{305nm} Absorbance \cdot d(\lambda)$$

Prin urmare, fiecare arie a suprafețe picului 285-305 nm pentru fiecare punct din intervalul lui Fe^{3+} este plotat pentru ilustrația grafică. Tendința curbei este plotată (Excel), ecuația (corelația coeficientului R^2 pentru care cea mai apropiată valoare de 1 validează experimentul) este dedusă (Excel).

Ea poate fi o formă lineară sau polinomială de tipul: $y = ax^2 + bx + c$. Prin experiment, această relație poate fi de tipul $y = -0,0021x^2 + 0,4819x + 0,4521$; $R^2 = 0,9966$ (Fig. 2) (4).

Pentru un amestec conform invenției, concentrația echivalentului Fe^{3+} produs într-un mediu de plasmă sau de Fe^{2+} este reflecția potențialului de oxidare din invenție și este calculat prin ecuație (4). Aceasta este o metodă indirectă pentru măsurarea eficienței redox a Amestecului 1 prin testarea în lumina UV a quercitinei oxidate de Fe^{3+} . Prin urmare, o concentrație a Fe^{3+} «echivalent» este menționată. De asemenea, este posibil de comparat potențialul redox a unei soluții conform invenției de testat, în raport cu o soluție de referință conform invenției, cu alte cuvinte de a face o comparație cu cuantificarea eficienței redox a unui amestec conform invenției.

2 - Fe^{2+} calcul.

În același mod ca și pentru ionul de Fe(III) , un calcul este produs pentru ionul de Fe(II) . De exemplu, absorbanta UV (230 - 500 nm) al picului quercitinei oxidate de către Fe^{3+} obținut dintr-un amestec din invenție la 1,22 μM de substanță activă (250 $\mu\text{g/L}$) și 2 min de contact cu Fe^{2+} este de exemplu măsurat pentru șirul descris mai sus. Aceleași analize matematice a AUC precum cele descrise pentru ionul de Fe(III) pot fi realizate.

3 - Testarea eficienței redox a amestecului din invenție de exemplu la 1,22 μM (250 $\mu\text{g/L}$) de substanță activă MoO_4^{2-} .

Conform procedurii descrise în B-, eficiența redox a unui amestec conform invenției (1,22 μM de MoO_4^{2-} în plasmă umană) este testată pentru: i) evaluarea îmbătrânirea sa la temperatura camerei și la 45°C, ii) validarea producerii sale și evaluarea comparativă a formulărilor, iii) cuantificarea pasajului său transcutanat, iv) biodisponibilitatea sa și, v) biofaza sa.

Conform ecuației (4), aria specifică a picului de absorbanta UV este calculată (ca un AUC) între 285 și 305 nm al picului quercitinei oxidate de către Fe^{3+} liber produs după contactul cu plasma pentru 2 min a amestecului din invenție (ecuațiile (1), (2) și (3)) la o concentrație finală de 1,22 μM cu complexul transferin- Fe^{3+} . În medie, producerea echivalentului de Fe^{3+} (Fe^{3+}_{eq}) este de ordinul de la 30 la 50 $\mu\text{g/ml}$ de plasmă.

4 - Calcul de estimare într-un mediu de plasmă a concentrației eficiente a amestecului conform invenției.

Fierul din plasmă nu este liber. Ea este legat de transferrin (sau siderofilin) în forma sa ferică (Fe^{3+}) într-o cantitate de la 1 la 2 resturi per moleculă. Fierul în forma sa fieroasă (Fe^{2+}) nu circulă în afara complexării sale cu hemoglobina. Se consideră că plasma umană folosită nu este hemolizată. Reacția quercitinei din amestecul din invenție cu cuprul din plasmă este considerată neglijabilă.

Un șir de concentrații a amestecului din invenție (15,2, 7,6, 3,8 și 1,9 nM al MoO_4^{2-} final) a fost incubat în plasma umană. Reacția cu quercitina a fost realizată precum cele descrise în B-. Picul de absorbție specifică (scăderea blank-ului plasmei + quercitina) a fost integrat precum cele descrise în B-1 (Fig. 3).

Calculul a fost plotat (Excel) la o scală polinomială și tendința ecuației a fost calculată ($y = 0,0144x^2 + 0,5863x + 0,4511$ cu $R^2 = 0,9934$ (5); Fig. 4).

O relație de proporționalitate (ecuația 5) este constatată între cantitatea din invenție într-o concentrație adăugată în plasma umană și cantitatea de echivalent de Fe^{3+} (ecuația 4) detectat prin reacția de oxidare a quercitinei, adică 28,95, 12,19, 3,97, 3,12 μg de $\text{Fe}^{3+}_{\text{eq}}$ /mL de plasmă umană, conform șirului amestecului din invenție descris mai sus.

Exemplul 5 - Evaluarea eficienței oxidării-reducerii din invenție asupra plasmei umane

După adăugare amestecul conform invenției (Exemplul 1 – Amestec 1”) la plasma umană și după un contact timp de 2 min, până la o concentrație de 0,03038 μM de MoO_4^{2-} , reacția de oxidare a quercitinei pentru producerea Fe^{3+} eliberat de la transferinul din complexul plasmă- Fe^{3+} și reacția Fenton-Haber-Weiss este optimum și linear (compar. Exemplul 4).

După scăderea blank-urilor experimentale, o creștere a concentrației din invenție generează o reducere a producerii *in situ* a quercitinei oxidate de Fe^{3+} din cauza deplasării echilibrului reacției Fenton-Haber-Weiss ($\text{Fe}^{3+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$). Concentrațiile finale testate de MoO_4^{2-} au fost apoi 0,00, 1,22, 4,05, 12,15, 24,30 și 30,38 μM (Fig. 5).

Exemplul 6 - Eficiența antireplicării

A - Modelele

- Patru modele de contact de amestec conform Exemplului 1 („Amestec 1”) au fost testate. Ele reprezintă patru posibilități fiziologice că Amestecul 1 poate fi întâlnit pe durata unei aplicații terapeutice topice, adică:

Model 1: Amestec 1 pe celule infectate cu HSV-1.

Model 2: Amestec 1 pe celule încă neinfectate cu HSV-1.

Model 3: Amestec 1 pe celule încă neinfectate și amestec 1 asupra HSV-1 liber (neinfecțios încă).

Model 4: Amestec 1 pe HSV-1 înainte de infectare.

- Doi timpi de contact a Amestecului 1 au fost testați, adică 2 min sau 1,5 min, și apoi îndepărtarea amestecului 1.

- Două concentrații de amestec 1 au fost testate: 0,81 și 2,03 μM de substanță activă, adică 167 și 417 $\mu\text{g/L}$, respectiv.

- Metodă pentru cuantificarea eficiențelor este qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction; Mullis K. et al. Specific Enzymatic Amplification of DNA *In vitro*: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1986, vol. 51 (Pt 1), p. 263-273.)

- Eficiența antireplicare (AE) a Amestecului 1 asupra HSV 1 a fost evaluată în qPCR cu primerii specifici ai genomului viral (Kessler H.H. et al. Detection of Herpes simplex virus DNA by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 2000, vol. 38(7), p. 2638-2642).

- Citotoxicitatea Amestecului 1 (C) asupra liniei BHK-21 a fost evaluată în qPCR cu primeri specifici ai genei sununității ribosomale mici 18S (Texcell - Evry, France).

- Multiplicitatea infecției (MOI): 1, adică $5,10^5$ TCID₅₀ (Doza inefectivă a culturii tisulare 50%).

- Experimentele qPCR au fost realizate la t0h (2 ore după contact între BHK-21 și HSV-1, și apoi îndepărtarea lui HSV-1), t2h-, t4h- și t8h-post-infecție.

- Raportul AE/C ne oferă Indicile de Eficiență *in vitro* (IE) a Amestecului 1 corespunzător la un model de studii.

Modelul 1:

BHK-21 + HSV-1 (2 ore; infecție) => spălare (PBS) pentru îndepărtarea virală => probe t0h => + Amestec 1 (2 min) => spălare (mediu de cultură) pentru îndepărtarea Amestecului 1 => incubarea celulelor la 37°C => probe t2h-, t4h- și t8h-post-infecție.

Modelul 2:

Modelul 3:

HSV-1 + Amestec 1 (1,5 si 2 min) => spălare (PBS) pentru îndepărtarea Amestecului 1.

10 Modelul 4:

B – Resultate

Tabelul 2

* Reducerea replicării HSV (RR) de către substanțele testate (Amestec 1, control aciclovir) este exprimată ca procentaj și corespunde la raportul cuantificărilor qPCR al genomurilor HSV-1 și al citotoxicității care este evaluată prin cuantificarea sub-unității 18S al celulei gazdă: $RR = \{ (100 \times ([HSV-1]_{test} / [18S]_{test})) / ([HSV-1]_{control+} / [18S]_{control+}) \} - 100$.

25 ** Indicele Eficienței Antireplicare *in vitro* (IE) al substanțelor testate este reprezentat prin $([HSV-1]/[18S])$ evaluată pe qPCR specifică al controlului pozitiv infectat cu HSV ($[HSV-1]_{control+}/[18S]_{control+}$) față de cel al substanțelor testate (Amestec 1, control aciclovir): $IE = ([HSV-1]_{control+}/[18S]_{control+}) / ([HSV-1]_{test}/[18S]_{test})$.

[ACV]: 1 g/L

30 - Cei mai buni EIs (Tabel 2) sunt obținuți după 2 minute de contact al Amestecului 1 și cu o concentrație de 417 $\mu\text{g/L}$. Observăm o influență semnificativă a timpului de contact asupra EIs (1,5 min și 2 min; modelele 2 și 3).

Els-urile obținute cu modelele 1 și 3 la un contact timp de 2 min și o concentrație a Amestecului 1 de 167 $\mu\text{g/L}$, sunt deosebit de semnificative.

- Indiferent de model, Eis-ul obținut cu aciclovir (“ACV”) nu sunt semnificative (Tabel 2).

35 Cuantificări procentuale prin qPCR (genă 18S sau HSV; la 8 ore post-contact de 2 min): i) al
multiplicării liniei BHK-21 (control: linie neinfectată) și, ii) al replicării HSV-1 (control: linie
infectată).

Tabelul 3

Tabelul 5									
Genă/genom	18S (%)						HSV (%)		
Control	Linie + (PBS – HSV)			Linie + (PBS + HSV)					
Substanță test	Amestec 1		ACV mg/L	Amestec 1		ACV mg/L	Amestec 1		ACV mg/L
[Substanță activă]	167 μg/L	417 μg/L		167 μg/L	417 μg/L		167 μg/L	417 μg/L	
Model 1	45	27	108 (1)	49	30	118 (1)	1	< 1	76 (1)

Model 2	62	41	57 (1)	68	44	62 (1)	19	2	61 (1)
Model 3	118	70	111 (1)	98	58	92 (1)	7	2	86 (1)
Model 4	120	107	97 (10 ³)	139	123	111 (10 ³)	64	38	54 (10 ³)
Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9

- Pentru Amestecul 1 (la 167 la 417 µg/L) sau ACV (la 1 sau 10³ mg/L), indiferent de controlul folosit (linie + PBS – HSV sau linie + PBS + HSV), cuantificarea rezultatelor lui 18S sunt comparabile pentru același model (Tabel 3, test 1 vs. 4, 2 vs. 5, 3 vs. 6).

5 - Pentru Amestecul 1, o eficiență anti-replicare remarcabilă în funcție de doză (Tabel 3, testele 7 și 8) este constatată pentru modelele 1, 2 și 3. Aceasta nu este observată pentru ACV (Tabel 3, test 9).

- O citotoxicitate comparabilă a Amestecului 1 (167 µg/L) și a ACV (1mg/L) (Tabel 3) se observă Conform modelelor 2 și 3 (Tabel 3, teste 1, 3, 4 și 6).

10 - O absența a eficienței anti-HSV (Tabel 2 și Tabel 3, test 9) pentru ACV (1 mg/L sau 1g/L) se observă. Modelele introduse pentru studiul Amestecului 1 nu pot corespunde la un studiu realizat cu ACV.

Pentru modelul 1 (Amestecul 1 pe celule infectate).

15 - Cel mai bun IE (Tabel 2) cu două concentrații de amestec 1 (2 min de contact, 167 și 417 µg/L, IE: 37 și 48, respectiv).

- Amestecul 1 are eficiență directă (Tabelele 2 și 3) asupra replicării virale intranucleare, asupra metabolismului celular probabil.

20 - Amestecul 1 are specificitate bună asupra celulelor infectate (Tabel 3, teste 4 și 5; model 1 vs. 2).

Pentru modelul 2 (Amestecul 1 pe o celulă înainte de infectare).

- Un IE interesant (Tabel 2; contact pentru 2 min și 417 µg/L, IE: 23).

25 - Amestecul 1 are o acțiune asupra celulei care devine puțin receptivă la infecție și/sau dobândește un metabolism incompatibil cu replicarea virusului (Tabel 3, teste 7 și 8).

Pentru modelul 3 (Amestecul 1 asupra celulei neinfectate și HSV-1, separat și înainte de amestecare).

30 - Un IE interesant (Tabel 2) cu două concentrații de amestec 1 (2 min de contact, 167 și 417 µg/L, IE: 14 și 35, respectiv).

- În funcție de doza aplicată (167 sau 417 µg/L) zero citotoxicitate (Tabel 3, test 4) sau citotoxicitate limitată (Tabel 3, test 5) pentru eficiență antivirală foarte bună (Tabel 3, testele 7 și 8, respectiv).

35 - Noi avem o eficiență a Amestecului 1 care ar fi o acumulare a modelului 2 cu o acțiune semnificativă asupra celulei și a modelului 4 cu o acțiune limitată doar asupra virusului (Tabelele 2 și 3).

Pentru modelul 4 (Amestecul 1 asupra HSV-1).

40 - Un IE jos (timp de contact: 2 min, 167 și 417 µg/L, IE: 2 și 3, respectiv; Tabel 2) care este confirmat prin absența toxicității dar replicare virală semnificativă (Tabel 3, teste 8 și 9).

C – Concluzii.

45 Asupra liniei BHK-21, principalele eficiente ale Amestecului 1 sunt: i) de a avea o toxicitate preferențială asupra celulelor infectate, ii) de a inhiba replicarea virală în celula infectată și, iii) de a limita infecția celulei sănătoase.

Ținta poate fi o membrană (receptori pentru viruși, de exemplu) și/sau metabolică (reglarea stresului și căilor apoptotice, de exemplu).

Recunoașterea virală și internalizarea.

50 Conform modelului 4, Amestecul 1 are o eficiență scăzută anti-replicare directă la viruși. În aceste condiții experimentale, apropiate de utilizarea terapeutică topică, această observație este în

favoarea unei alterări limitate a receptorilor virali la celulă: gB (HSV-2), gC (HSV-1), gD și gH/gL (HSV-1 și -2). Amestecul 1 ar schimba doar într-un mod limitat glicoproteinele virale prin reacția sa Fenton-Haber-Weiss *in vitro*.

Similar, nu am observat influență semnificantă a Amestecului 1 asupra membranei fosfolipidice a HSV care poate perturba penetrarea și fuziunea membranei.

În aceste condiții experimentale, Amestecul 1 nu este un virucid.

Replicarea virală și metabolismul celular.

Tehnica qPCR folosește lizatul celular la 8 ore post-infecție. O reducere în replicarea virală poate rezulta de la recunoașterea slabă și/sau internalizarea și/sau replicarea (modificarea metabolismului celular indus de infecție și/sau Amestecul 1).

Dacă calea de desalinizare virală a fost modificată de Amestecul 1 fără modificare altor rute și indiferent de model, Els-ul rezultat ar fi mult mai mic din cauza acumulării citoplasmice a virionilor.

Conform modelului 2 (IE: 23 cu 2 min de timp de contact și 417 $\mu\text{g/L}$), replicarea virală joasă după contactul preliminar al celulei cu Amestecul 1 (Tabel 2 și Tabel 3, test 8) este observată.

Conform acestui model, celula BHK-21 a fost în contact timp de 2 min cu Amestecul 1. Timpul de contact cu HSV într-un mediu complet și nutritiv de cultură a fost 2 ore. Amestecul 1 a indus modificările celulelor având o durată de viață ce durează mai mult de 2 ore și anticipând în continuare eficiența profilactică a Amestecului 1.

În plus la recunoașterea lui HSV-1 de către celulele parțial afectate de Amestecul 1 din cauza acțiunii probabile și limitate asupra glicoproteinei virale gD (38% din replicare; Tabel 2), Această recunoaștere poate de asemenea fi afectată printr-o acțiune asupra receptorilor celulari la gD (HVEM și nectin) precum și asupra altor doi receptori celulari de suprafață la gB și gH/gL care are heparan sulfati și integre.

Din cauza pătrunderii radicalice (modificarea potențialului redox intracelular și transmembranar, reglarea căilor de stres oxidativ), influxurile celulare de calciu pot fi mișcate. Aceste influxuri celulare de calciu sunt de asemenea induse de infecția HSV. În orice caz ultimile pot fi demobilizate imediat din cauza introducerii în Amestecul 1 a agenților de chelare liberi și non-permeabili (limitarea citotoxicității celulare). Alte modificări celulare majore din altă parte nu trebuie excluse și pot corespunde reducerilor și oxidărilor proteinelor (punți cisteinil, de exemplu) și în particular a proteinelor structurale care pot decurge în endocitozele virale.

Conform modelului 3 (Tabel 2 și Tabel 3, teste 7 și 8), o reducere semnificativă în replicarea virală este observată (IE: 14 și 35 pentru 2 min de timp de contact, 167 și 417 $\mu\text{g/L}$, respectiv).

Ambele fenomene se acumulează. Primul este o acțiune limitată la viruși (compar. modelul 4), al doilea mai semnificativ (compar. modelul 2) este la celulă.

Adăugarea Els-ului al modelelor 2 și 4 (2 min și 417 $\mu\text{g/L}$), adică 23 și 3, respectiv, oferă o sumă (26) mai puțin decât dar apropiată de cea obținută experimental pentru modelul 3, adică 35.

O acumulare potențială i) de recunoaștere slabă a partenerilor HSV și celule este contemplată și ii) o internaționalizare inhibată și/sau replicarea în special prin modificarea metabolismului celular.

Modelul 1 (IE: 48 cu 2 min de timp de contact și 417 $\mu\text{g/L}$) este cel mai performant.

Acțiunea amestecului antiinfecțios 1 este preferential asupra celulei decât asupra virușilor. Această acțiune este cu atât mai mult performantă, deoarece celula este infectată în prealabil.

În acest model care corespunde cu cea mai bună problemă terapeutică, este evident că Amestecul 1 are o eficiență farmacologică intracelulară specifică majoră. Pentru 417 $\mu\text{g/L}$ de substanță activă, Tabelul 3 arată că cantitatea de sub-unități ribozomale 18S este joasă (în funcție de controlul folosit, 27 și 30%, teste 2 și 5) în acest model ca în modelul 2 (în funcție de controlul folosit, 41 și 44%, teste 2 și 5) și în modelul 3 (în funcție de controlul folosit, 70 și 58%, teste 2 și 5) care este un argument pentru specificitatea celulelor infectate vs. celulele sănătoase.

Țintele Amestecului 1 în acest model nu pot fi nici recunoașterea sau internalizarea, dar de fapt modificările metabolice. Ultimile sunt plasate într-un echilibru nou, în special din cauza pasajului radicalic transmembranar, modificarea potențialului redox al celulelor și prezența agenților de chelare externi, între căile de stres oxidativ (deja indus de infecție), fluxurile de calciu (deja indus de infecție), inhibarea eliberării dependentă de calciu a virionilor, modificările prin oxidare a proteinelor direct sau indirect implicate în replicarea virală.

Exemplul 7 - Evaluarea *ex vivo* a producerii interleucinelor

Biopsiile neopatologice (8 biopsii și 4 donori) a pielii umane provenite de la operațiile chirurgicale pentru reducerea greutateii au fost tratate *ex vivo* cu Amestecul 1 (5 mg/L de substanță activă; 2 min). Supernatantii în care biopsiile au fost găsite au fost eșantionate la 6 ore și 24 ore post-

contact cu scopul de a cuantifica interferonii- α (IFN- α ; inhibition of the infection with HSV; Mikloska Z. et al. Alpha and Gamma Interferons Inhibit Herpes Simplex Virus Type 1 Infection and Spread in Epidermal Cells after Axonal Transmission. J. Virol., 2001, vol. 75(23), p. 11821-11826), - β (IFN- β ; inhibition of HSV replication; Sainz Jr. B. et al. Alpha/Beta Interferon and Gamma Interferon Synergize To Inhibit the Replication of Herpes Simplex Virus Type 1. J. Virol., 2002, vol. 76(22), p. 11541-11550) și interleucin 6 (IL-6; inflammation marker).

Controlul experimental pozitiv este un solut fiziologic (NaCl 100mM).

Nicio modificare a nivelului de bază celular al IFN-a și IFN-b nu a fost observat.

În funcție de biopsii și de donori și prin urmare de trauma operației chirurgicale și manipulării experimentale.

La 6 ore post-contact (Fig. 6 și 7):

- cu NaCl ca un control, producerea de IL-6 bazal de 277 pg/mL $\pm$ 11 la 2,866 pg/mL $\pm$ 206.

- cu Amestecul 1, inhibiția al producerii IL-6 în raport cu controlul NaCl, de la 0 pg/mL la 1,015 pg/mL $\pm$ 17.

La 24 ore post-contact (Fig. 6 și 7):

- cu NaCl control, producerea bazală a IL-6 de 1,485 pg/mL $\pm$ 37 la 7,454 pg/mL $\pm$ 199.

- cu Amestecul 1, inhibiția producerii IL-6 în raport cu controlul NaCl, de 84 pg/mL $\pm$ 15 la 5,910 pg/mL $\pm$ 29.

Concluzii:

- producerea și heterogenitatea supraproducerii (6 ore și 24 ore, respectiv) pentru IL-6 post-contact NaCl și Amestecul 1 (Fig. 6).

- o inhibiție heterogenă a producerii IL-6 post-contact cu Amestecul 1 (5 mg/L de substanță activă) care este în medie 28% la 6 ore și 19% la 24 ore, în raport cu controlul NaCl (Fig. 6).

Prin această inhibiție a producerii, Amestecul 1 are proprietatea de a fi un antiinflamator (Fig. 7).

Exemplul 8 - Degradarea plasmă și ½ viață.

Unul din donorii de radicali (în special $\text{HO}_2^\cdot$, care are o durată de viață până la câteva secunde și un indice de penetrare a celulelor notabil) printr-o reacție de tip Fenton-Haber-Weiss a substanței active MoO_4^{2-} a Amestecului 1 este H_2O_2 . Degradarea acestui traser a fost urmată pentru evaluarea ratei de consum a Amestecului 1 sau dezactivării lui.

Tehnica.

Amestecul 1 (68,9 μM sau final 14,2 $\mu\text{g/L}$) a fost incubat în plasmă umană proaspătă. Cinetica dispariției H_2O_2 a fost urmată de o reacție peroxidazică asupra alicotelor eșantionate la timpuri succesive.

Rezultate.

- În medie ($n = 10$), procentajul degradării a substanței traser a Amestecului 1 în plasmă umană la temperatura camerei după un contact timp de 2 min este de 85.3 $\pm$ 9.4%, 74% $\pm$ 15.2 % din care în primul minut.

- În primul minut, „Timpul de Degradare 50%” sau $\text{DT}_{50} = 0,812$ min pentru o soluție de amestec 1 la un inițial de 68,9 μM de substanță activă și inițial 1mM de H_2O_2 .

- Rata de degradare $\text{K}_{\text{cH}_2\text{O}_2} \approx 740$ μmoli de Amestec 1 la un inițial de 1mM de H_2O_2 /min./L de plasmă sau $\text{K}_{\text{cMoO}_4^{2-}} \approx 51,0$ μmoli de Amestec 1 la inițial 68,9 μM de substanță activă MoO_4^{2-} /min./L de plasmă, în primul minut de incubare la temperatura camerei.

- Pentru o probă de 200 μL a Amestecului 1 la 24,3 μM (5,0 mg/L) de substanță activă sau 353 mM (12 g/L) de traser H_2O_2 , cu scopul unei aplicații terapeutice topice, unde sunt ≈ 5 nmoli de substanță activă MoO_4^{2-} sau 70 μmoli de traser H_2O_2 . Aceasta probă, în 1L de plasmă, este degradată în $\approx 0,1$ minute.

Exemplul 9 - Hematotoxicitate limitată asupra sângelui periferic.

Scopul acestui studiu este de a evalua hematotoxicitatea Amestecului 1 (24,3 μM sau final 5,0 mg/L) după incubare de 2, 3 și 5 minute în sânge periferic uman. Toxicitatea pentru care hematoliza este evaluată urmând principalii parametri ai sângelui, adică numărarea eritrocitelor, leucocitelor, hematociteelor, a trombocitelor, volumul mediului al globulelor și nivelul hemoglobinei.

Concluzii.

Parametrii hematologici referitori la numărul de eritrocite, leucocite, hematocite, volumul mediu al globulelor și nivelul hemoglobinei nu sunt modificate prin incubare timp de până la 5 minute cu amestecul conform invenției.

Numărul de trombocite este modificat prin contactul cu Amestecul 1 de la -35% imediat după adăugarea acestuia, la -69% la 5 minute.

Exemplul 10 - Pasajul transcutanat limitat al amestecului conform invenției, absorbția, biofaza și biodisponibilitatea (OECD 428; EMEA, Uman Guideline, 2001).

Amestecul 1 utilizat a fost de cinci ori mai concentrat (Amestec 1 x 5) pentru a arăta cele mai mici pasaje substanțelor. Scopul acestui studiu a fost de a evalua (referință t0, t 2min., până la t60min) trecerea Amestecului 1 x 5, precum și a markerului H₂O₂ prin biopsiile neopatologice ale pielii umane.

Această procedură se aplică la trei tipuri de substrat: biopsie totală, biopsie disecată în epidermă pe de o parte și în dermă pe de altă parte.

Tehnica.

Au fost testate 12 biopsiile de la 2 donatori (măsurători în picătură depuse pe fragmente [30 μL]) și în mediu sub acestea (800 μL), conform ambelor metode (Tabelul 4): i) quercetina care evaluează eficiența redox a Amestecului 1x5 și, ii) peroxidaza care măsoară concentrația H₂O₂ a markerului.

Picătura (30 μL) depusă deasupra biopsiilor și a fragmentelor epidermale și dermice este de 5 ori mai concentrată în substanța activă (121,5 μM sau 25,02 mg/L) și în marker (1,77 M sau 60 g / L) decât formularea terapeutică. În 30 μL de depuneri de Amestec 1x5, există 3,65 nmoli sau 750 ng substanță activă și 53 μmol sau 1,8 mg marker.

Rezultate:

Tabel 4

	Test	Trial	Biopsie*	Epidermă*	Dermă*
Picătură	1	Eficiență redox	-1,4 la -10,5	-5,7 la -23,9	NT
	2	marker H ₂ O ₂	-16,5 la -57,7	-72,5 la -99,9	-99,6
Mediu	3	Eficiență redox	+3,7 la +9,0	+0,8 la +80,6	+44,5 la +100
	4	H ₂ O ₂ marker	< +0,001** la +0,09	+0,38 la +1,7	+0,16 la +0,46

* în % în raport cu t 0 (-: descreștere, +: creștere)

** limite de detecție.

Se observă o scădere de la joasă până la moderată (testul 1) a eficienței redox a Amestecului 1 în picătură deasupra fragmentului (de la -1,4 la -23,9%).

Se observă o scădere moderată până la semnificativă (testul 2) a cantității de marker H₂O₂ din Amestecul 1 în picătură deasupra fragmentului (de la -16,5 la -99,9%).

Se observă o creștere ușoară până la semnificativă (testul 3) a eficienței redox a mediului sub fragment. Ea depinde de fragment și de tipul acestuia. Când aceasta este o biopsie completă, această creștere datorată trecerii transcutanate este scăzută. În medie, acesta este de 6,35% și corespunde trecerii a 232 pmoli (47,6 ng) de substanță activă din Amestecul 1. Când aceasta este epiderma sau derma, această creștere este foarte variabilă (de la 0,8 la 100%). Acest lucru se datorează probabil diferențelor în structurile histologice (porii, irigarea dermică a sângelui, terminarea nervilor epidermici, de exemplu).

O creștere de la nedetectabilă la ușoară (testul 4) a cantității de marker H₂O₂ în mediu sub fragment este observată indiferent de tipul său (de la <+ 0,001 la 1,7%). Atunci când aceasta este o biopsie completă, această creștere datorată trecerii transcutanate este deosebit de scăzută (<0,53 până la 47,7 nmoli, adică <0,018 până la 1,62 μg). Când aceasta este epiderma sau dermul, în medie, această creștere este scăzută (1,04 și 0,31%, adică 0,55 μmoli și 0,16 μmoli sau 18,7 μg și 5,6 μg respectiv).

Concluzii.

Există independență tisulară (absorbție, dezactivare, permeație) a celor doi parametri considerați ca fiind tipici pentru Amestec 1, care sunt eficiența redox datorită substanței active și dozei de marker peroxid, un donator de radicali.

Luând în considerare biopsia totală, indicele de penetrare a Amestecului 1 corespunde grosimii fragmentului, adică 1 mm (grosime medie a epidermei) până la 2 mm.

Epiderma conține multe terminații nervoase care pot fi centrul desalinizării axonului de virioni herpetici la pacient. Acestea sunt țintele Amestecului 1 în același mod ca celulele epidermice infectate sau înainte de o posibilă infecție. Luând în considerare succesiunea ambelor țesuturi, biofaza Amestecului 1 este cvasi-strict cea a grosimii epidermei (1 mm) și este atinsă în totalitate pentru absorbția țesutului țintă maxim.

Luând în considerare că doar derma este vascularizată, cel mult 80,6% din eficiența redox a Amestecului 1 poate fi găsită din nou la contactul său și la 1,7% din marker. În aceste condiții experimentale, biodisponibilitatea Amestecului 1 x 5 este de 2,94 nmol sau 605 ng substanță activă și 0,9 μmol sau 30,6 μg de marker peroxid.

Într-un studiu de genotoxicitate *in vitro*, cu testul Ames, amestecul conform invenției și metabolizii săi nu este mutagenic în prezența activatorului S9 (5/5 tulpini de Salmonella), este mutagenic la 1/5 tulpină în absența sa.

La aplicarea locală pe piele, fie stimulată sau nu, amestecul conform invenției (24,3 μ M sau 5,0 mg/L de substanță activă) nu are asociată nici o toxicitate legată iritare.

Într-un studiu a iritației bucale și vaginale, amestecul conform invenției (24,3 μ M sau 5,0 mg/L) nu este iritant (scor 0/16) și foarte slab (scor 1/16), respectiv.

Într-un studiu extrem de sensibil al iritației membranei chorioalantoice a unui ou de găină, Amestecul 1 (18,23 și 24,3 μ M sau 3,75 și 5,0 mg/L) este moderat iritant (Indice de iritare sau II = 6,8 $\pm$ 0,4 și 6,3 $\pm$ 0/21, respectiv).

Într-un studiu de toxicitate acută prin aplicare dermică, amestecul conform invenției la doze de 25,0 și 31,3 μ g/kg de substanță activă conținută în 60 și respectiv 75 mg/kg de marker H₂O₂ este bine tolerat fără nici un simptom, pentru o doză maximă tolerabilă (DMT) și o doză maximă fără efecte dăunătoare observate (DMFEDO) sau "NOEEL" de 31,3 μ g/kg de substanță activă și 75 mg/kg de marker.

Într-un studiu de toxicitate acută cu injecție intravenoasă, amestecul conform invenției la doze de 10,4 și 12,5 μ g/kg de substanță activă conținute în 25 și respectiv 30 mg/kg de marker de H₂O₂, este tolerat fără simptome notabile pentru o "Doză maximă tolerantă" (DMT) de 12,5 μ g/kg substanță activă.

Exemplul 11 - Toxicitate acceptabilă a amestecului conform invenției

I – Mutagenitate *in vitro* (Test Ames– OECD 471)

Scopul acestui studiu a fost evaluarea activității mutagene a amestecului activ conform invenției (Amestecul 1) și a metabolizilor săi (produsi de fracția S9 a unui ficat de șobolan) pe tulpinile de *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA102 și TA1535.

Concluzii.

- Fără nici un sistem de activare S9, amestecul activ (7,7 μ M sau 2,43 μ M, adică 1,58 mg/L sau 0,50 mg/L) conform invenției și metabolizii săi nu au efecte mutagene asupra liniilor TA97a, TA98, TA100 și TA1535.

- Cu un sistem de activare S9, amestecul activ (Amestec 1 x 5: 121,5 μ M sau 25,02 mg/L) conform invenției și metabolizii săi nu au efecte mutagene asupra liniilor TA97a, TA98, TA100, TA102 și TA1535.

- Fără nici un sistem de activare S9, amestecul activ conform invenției nu este mutagenic asupra liniei TA102 la 0.50 mg/L.

În acest test *in vitro*, efectul mutagen al amestecului activ și al metabolizilor săi, conform invenției, este limitat pentru utilizarea sa (tulpina TA102).

II – Dermato-sensibilizarea după inducție (femela de hamster, OECD 406, ISO 10993-10: 2013 și Memorandumul ICH SCCP 2005)

Conform protocolul Magnusson & Kligman (Magnusson B. et al. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test", J. Invest. Dermatol., 1969, vol. 52(3), p. 268-276), potențialitățile de sensibilizare ale pielii femelelor de hamster au fost studiate în conformitate cu trei protocoale.

Protocolul 1: Determinarea dozei limită tolerate.

Concentrațiile Amestecului 1 de la 1,25 mg/L la 20,00 mg/L de substanță activă conținute în 3 g/L până la 48 g/L de marker H₂O₂, respectiv într-un „plasture” de 1 ml au fost aplicate timp de 24 de ore pe flancul animalelor, iar apoi animalele au fost observate.

Concentrația Amestecului 1 la 10 mg/L substanță activă în 24 g/L de marker este bine tolerată și provoacă iritații moderate.

Concentrația Amestecului 1 la 5,0 mg/L de substanță activă conținută în 12 g/L de marker H₂O₂ este bine tolerată și este considerată ca doza maximă neiritantă.

Protocolul 2: Determinarea dozei limită tolerate după inducție prin injectare subcutanată.

Concentrații de la 5 mg/L la 10 mg/L de substanță activă conținute în 12 g/L la 24 g/L de marker H₂O₂, respectiv, a Amestecului 1 au fost injectate (100 μ L) printr-o cale subcutanată. La 8 zile (prima provocare), a fost realizată o primă aplicare locală ca un plasture de 1 ml. La 27 zile (a doua provocare) a fost realizată o a doua aplicație locală ca un "plasture" de 1 ml. Observațiile au fost făcute la 29 de zile.

Concentrația Amestecului 1 la 5 mg/L de substanță activă, conținută în 12 g/L de marker, este bine tolerată și nu produce iritații.

Protocolul 3: Studiul iritației induse de stimulare și aplicare topică a Amestecului 1 la 5 mg / l de substanță activă conținută în 12 g/L de marker H₂O₂.

Au fost injectate 100 μ l de amestec 1 la 5,0 mg/L pe cale subcutanată. La 4 zile, zona injectată a fost stimulată cu o soluție de dodecil sulfat de sodiu (SDS) la 10% înainte de aplicarea topică a Amestecului 1 (1 ml) într-un „plasture”. La 6 zile, a fost realizată o a doua aplicare topică. La 21 zile (provocare) s-a obținut o aplicare topică a Amestecului 1 (1 ml) într-un "plasture" cu concentrații de 6,26 până la 10 mg/L de substanță activă conținută în 15 până la 24 g/L de marker.

Amestecul 1 la 5,0 mg/L de substanță activă conținut în 12 g/L de marker este bine tolerat și scorul sensibilizării cutanate de către formulare este egal cu 0/3.

Concluzii: Amestecul 1 la 5,0 mg/L de substanță activă nu este iritant. Nu a fost observată nici o modificare macroscopică a pielii animalelor. În consecință, nu este nevoie de nici un studiu anatomo-patologic.

III – Iritare bucală și vaginală (iepure femelă, OECD (99) 20, -21, -23 -24, - (95) 115, - (02) 9 și ISO-10993-10.

Scopul acestui studiu a fost de a evalua toleranța vaginală și bucală a Amestecului 1 la 5,0 mg/L de substanță activă conținută în 12 mg/L de marker conform unei expuneri compatibile cu o utilizare terapeutică umană de 5 zile.

De la ziua 0 la ziua 6, la fiecare 24 ore, animalele sunt tratate (1 ml) printr-o cale bucală și vaginală. La ziua 7, animalele sunt observate și măsurată greutatea acestora.

Concluzii: Concentrația Amestecului 1 la 5,0 mg/L substanță activă este bine tolerată. Indicele iritației bucale și vaginale este de 0/16, respectiv de 1/16. În consecință, nu este nevoie de un studiu anatomo-patologic.

IV – Test de iritare ocular (ICCVAM App B).

Testul de iritare oculară a folosit testul de substituție HET-CAM (Testul de ouă de găină - Membrana Chorioalantoică), publicat în Jurnalul Oficial din 26/12/1996. Ea este recomandată de ICCVAM.

Deși această metodă deosebit de sensibilă nu este validată oficial de U.E., aceasta este acceptată pentru o utilizare care are ca scop localizarea substanțelor chiar ușor iritante, inclusiv a celor care ar fi iritante oculare, pentru a le atribui eticheta R41 (2002)

Pe scurt, metoda constă în aplicarea unei substanțe de testat a Amestecului 1 la 3,75 și 5,00 mg/L dintr-o substanță activă în 9 și respectiv 12 g/L de marker pe membrana chorioalantoică a unui ou fertilizat de găină. La 0,5, 2 și 5 minute după contact, se observă și se notează următoarele trei criterii: hemoragie, coagulare și hiperemie.

Rezultate și concluzii.

Amestecul 1 la 3,75 mg/L sau 5,00 mg/L de substanță activă poate fi clasificat ca fiind moderat iritant (indice de iritare sau II = $6,8 \pm 0,4$ și respectiv $6,3 \pm 0,21$), adică induce o ușoară liză (severitate = 1/3) imediat după introducere sau la 30 de zile după contact, fără hemoragie sau coagulare.

Având în vedere valoarea Q (raportul dintre indicii între substanțele de referință pozitive NaOH 0,1M [ESTE = 15 ± 3] și 1% SDS [10 ± 2] vs. Amestecul 1), Q vs. NaOH = 0,51 la 0,54 și Q vs. SDS = 1,10 la 1,18 pentru Amestecul 1 la 3,75 și 5,00 mg/L de substanță activă, respectiv.

Prin urmare, în ceea ce privește acest test de sensibilitate extremă, care este mult mai semnificativ decât testul de iritare a vaginului deja desfășurat asupra iepurilor de sex feminin, Amestecul 1 este considerat ca fiind o substanță de la ușor (3,75 mg / l) până la moderat (5,00 mg / l) iritantă.

V – Studiul toxicității acute prin aplicarea cutanată și injectarea intravenoasă - Dozele maxime tolerate (DMT) și doza fără efect toxic observabil (NOAEL) (șobolan, OECD 474, ICH M3 (R2) și S6 (R1)).

Scopul acestui studiu este de a determina doza maximă tolerantă (DMT) a Amestecului 1 prin aplicare cutanată (1 ml) sau prin injecție intra-caudală (5 ml/kg). Observațiile clinice sunt raportate până în ziua 14.

Concluziile protocolului aplicării cutanate.

Amestecul 1 are o doză de 50 μ g/kg de substanță activă (1 ml până la 10 mg/L), care este bine tolerată. Se observă un ușor eritem al zonei tratate, precum și apariția unor cruste mici care dispăre în decurs de 2 zile. Nu se observă iritații.

Aceleași simptome în mod proporțional mai reduse sunt observate pentru o aplicare a Amestecului 1 de 37,5 μ g/kg substanță activă (1 ml la 7,5 mg/L).

Amestecul 1 la doze de 25,0 și 31,3 μ g/kg de substanță activă (1 ml la 5,0 și 6,26 mg / l) este bine tolerat. Nu se observă simptome cutanate, metabolice sau fiziologice la D14.

DMT a Amestecului 1 la o aplicare cutanată la șobolani este de 31,3 μg / kg de substanță activă (1 ml la 6,26 mg/L).

NOAEL (doză fără efect toxic observabil) a Amestecului 1 în administrare cutanată la șobolani este de 31,3 μg /kg de substanță activă (1 ml la 6,26 mg/L).

5 Concluziile protocolului de injectare intra-caudală.

10 Dificultatea administrării intravenoase a Amestecului 1 nu se află într-o toxicitate intrinsecă a invenției, ci pe descompunerea sa în contact cu sângele care generează în mod special oxigen molecular care poate fi responsabil pentru embolie. Doza limită etică (3 șobolani) care au demonstrat un stop respirator reversibil este de 14,6 μg /kg de substanță activă (5 ml/kg din Amestecul 1 la 2,92 mg/L). Nu s-au înregistrat semne de toxicitate până la D14.

Amestecul 1 este tolerat după injectarea intravenoasă la 12,5 μg /kg substanță activă (5 ml/kg din Amestecul 1 la 2,5 mg/L). Dificultăți fiziologice (mișcări și dificultăți respiratorii) au fost observate la animale la momentul injectării. Nu s-au înregistrat semne de toxicitate până la D14.

15 Aceleași simptome, proporțional mai puțin semnificative, au fost observate după o injecție intravenoasă la 10,4 μg /kg de substanță activă (5 ml/kg din Amestecul 1 la 2,1 mg/L). Nu a fost nini un semnal clinic sau modificare a curbei de greutate. Nu s-au înregistrat semne de toxicitate până la D14. Observarea macroscopică a organelor la D14 după autopsie nu a dezvăluit nimic.

DMT a Amestecului 1 într-o injecție intra-caudală este 12,5 μg /kg de substanță activă (5 ml/kg de Amestecului 1 la 2,5 mg/L).

20 **VI – Studiul genotoxicității *in vivo* prin căutarea generării micronucleilor după injectarea intravenoasă a Amestecului 1 (masculi și femele de șobolan, OECD 474 și ICH S2 (R1)).**

25 Au fost injectate femele de șobolan (n=5) și șobolani masculi (n=5) (două tratamente la un interval de 22-26 ore, 5 ml / kg) cu transportorul de apă HPLC (cale intravenoasă) și 10 mg / kg, cale intravenoasă și metansulfonat de etil la 100 și 150 mg / kg (cale intraperitoneală) și Amestecul 1 la 1,46, 4,17 și 12,5 μg / kg substanță activă (cale intravenoasă).

30 Au fost observate morbiditatea, mortalitatea, greutatea animalelor și parametrii clinici (temperatura, pielea, părul, ochii, membranele mucoase, secrețiile și excrețiile, funcția respiratorie și neurologică, mersul și postura). 36 ore la 48 ore după cel de-al doilea tratament, sângele animalelor a fost colectat și analizat în citometrie în flux (controlul toxicității: reducerea proporției eritrocitelor imature (CD-71-pozitive). Proporția de eritrocite imature micro-nucleate (reticulocite) a fost evaluată pe 4.000 de observații pe probă de sânge. Fiecare populație de șobolani (n = 10) pentru fiecare substanță testată reprezintă 40.000 de observații (Tabelul 5).

Tabelul 5

Substanță	mg/kg	Sex	n	Reticulocite (%)	Reticulocitele micronucleate (%)
Înainte de tratament	#	mascul	5	4,39±0,92	0,15±0,09
		femelă	5	2,60±0,57	0,17±0,07
Controlul negativ Apă	#	mascul	5	5,17±1,47	0,32±0,31
		femelă	5	3,82±0,29	0,12±0,04
Control pozitiv 1 ciclofosfamida	5	mascul	5	3,99±0,49	0,56±0,17
		femelă	5	2,41±0,54	0,40±0,13
	10	mascul	5	1,95±0,59	1,62±0,29
		femelă	5	1,30±0,43	1,02±0,26**
Control pozitiv 2 Metansulfonat	100	mascul	5	1,41±0,32	0,68±0,35**
		femelă	5	1,86±0,25	0,48±0,16**
	150	mascul	5	1,33±0,34	0,81±0,48**
		femelă	5	0,45±0,33	0,59±0,26**
Amestecul 1	1,46 .10 ⁻³ #	mascul	5	5,32±0,76	0,10±0,02
		femelă	5	3,35±0,46	0,09±0,03
	4,17 .10 ⁻³ #	mascul	5	4,82±0,41	0,11±0,03
		femelă	5	3,35±0,83	0,09±0,02
	12.5 .10 ⁻³ #	mascul	5 3*	4,79±0,16	0,22±0,12
		femelă	5 1*	3,40±0,19	0,09±0,02

* animalele moarte în timpul primului tratament prin embolie datorită eliberării oxigenului molecular din Amestecul 1 în contact cu sângele.

** statistic diferit de grupul de control.

în substanță activă MoO_4^{2-}

5

Conclusion: În comparație cu grupurile de control (pozitive și negative), Amestecul 1 nu are nicio genotoxicitate prin inducerea producției de reticulocite micro-nucleate după injecția intravenoasă la șobolani ($n = 10$, incluzând 5 masculi și 5 femele) cu un interval de 1,46, 4,17 și 12,5 $\mu\text{g/kg}$ substanță activă.

10

Exemplul 12 - Comparație cu alte compoziții.

Prezentul exemplu arată în mod deosebit influența compoziției, în special a potențialului redox asupra:

1 - rolului calciului în cataliza Fenton/Haber-Weiss "precum" formulărilor testate;

2 - existenței unei diferențe între trei formulări de substanță activă de 5,0 mg/L.

15

S1: Amestecul 1,

S2: compoziție conform US 6,660,289,

S3: compoziție conform WO/2010/004161.

20

Protocolul 1 (Tabele 6 și 7):

- 2 parametri măsurați: i) pH, ii) potențial redox.

- catalizator CaCl_2 (1M, în H_2O): Adăugarea într-o concentrație finală de 24 mM

- cinetică: inițială (T_0), 1, 2, 3 minute (T_1 , T_2 , T_3) după adăugarea de CaCl_2 cu agitare.

Rezultate și descriere.

25

Tabelul 6

Soluția S1	T_0	CaCl_2 24mM	T_1	T_2	T_3	Medie (între T_1 și T_3)	D / T_0
pH	4,70	↓ la T_0	4,58	4,59	4,59	4,59 timp de 3 min.	-0,11
Pot. Redox E° (mV)	359		383	383	383	383 timp de 3 min.	+24
Soluția S2	T_0	CaCl_2 24mM	T_1	T_2	T_3	Medie (între T_1 și T_3)	D / T_0
pH	2,85	↓ la T_0	2,65	2,65	2,66	2,65 timp de 3 min	-0,20
Pot. Redox E° (mV)	437		479	475	474	476 timp de 3 min	+39
Soluția S3	T_0	CaCl_2 24mM	T_1	T_2	T_3	Medie (între T_1 și T_3)	D / T_0
pH	3,01	↓ la T_0	2,86	2,87	2,87	2,87 timp de 3 min.	-0,14
Pot. Redox E° (mV)	414		465	464	464	464 timp de 3 min	+50

pH-ul pielii este de la 4,93 +/- 0,45 până la 5,12 +/- 0,56. pH-ul vaginal este în mod normal de ordinul 4,50 și poate varia până la 6,00 la menopauză.

30

- Soluția S1 este tamponată și la un pH de ordinul unuia dintre pielea umană și membranele mucoase. Acest pH rămâne relativ constant până la 3 minute de contact după adăugarea a 24 mM CaCl_2 final. Se observă o creștere moderată a E° , care poate proveni parțial din adăugarea clorului din CaCl_2 .

- Un pH acid amplifică peroxidarea citotoxică a lipidelor mediată de fier.

35

Soluția S2 nu este tamponată. pH-ul său nu este foarte compatibil pentru contactul cu pielea sau mucoasa (inclusiv distrugerea probabilă a florei comensale într-o utilizare terapeutică). Acest pH rămâne relativ constant până la 3 minute de contact după adăugarea de CaCl_2 la o valoare finală de 24 mM. Se observă o creștere cel puțin un pic mai moderată față de S1 din E° , care poate proveni parțial din adăugarea clorului din CaCl_2 .

40

Soluția S3 nu este tamponată. pH-ul său nu este foarte compatibil pentru contactul cu pielea sau membranele mucoase (inclusiv distrugerea probabilă a florei comensale într-o utilizare terapeutică). Acest pH rămâne relativ constant până la 3 minute de contact după adăugarea a 24 mM CaCl_2 final. Se observă o creștere semnificativă (+ 50mV) a E° , care poate proveni parțial din adăugarea clorului din CaCl_2 , dar cu privire la diferența de creștere potențială față de S1 și S2, probabil că nu ar fi acest singur factor.

45

În ceea ce privește ionii Fe *in situ*, la un pH acid (<2,33), potențialul redox este de ordinul 400 mV și Fe în forma (III), adică în forma sa cea mai citotoxică. La un pH de ordinul 4,5, potențialul

redox este de ordinul a 300 mV, hemoglobina Fe în forma (II) și plasma Fe complexată cu transferină în forma (III).

La pH-ul soluțiilor S2 și S3, oxidul de fier formează $\text{Fe}(\text{OH})_3$ foarte dezavantajat. În consecință, reacțiile Fenton-Haber-Weiss nu sunt foarte eficiente.

5 Valoarea potențialului perechii $\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}$ (tip Fenton) este: $E^\circ = 1,19 - 0,18 \times \text{pH}$.

Tabelul 7

	Subst. act. (mg/L)	pH	$E^\circ_{\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}} \text{ (mV)}^*$	$E^\circ_{\text{Soluția}} \text{ (mV)}$
S1	5,0	4,70	344	354
S2	5,0	2,80	686	428
S3	5,0	3,00	650	418

* nivel celular cu fier *in situ*

10 Conform acestui studiu, există o confirmare a faptului că perechea $\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}$ este dezavantajată. Chiar dacă potențialul redox al acestei perechi este îmbunătățit (418 – 428 mV), acesta rămâne prea semnificativ pentru contactul celular.

15 - potențialul transmembranar al unei celule animale este negativ (≈ -70 mV). Cu cât este mai semnificativ potențialul de reducere a oxidării soluției, cu atât mai mare va fi modificarea potențialului transmembranar și mai mare va fi inducerea stresului oxidativ celular (inducerea genetică a apoptozei, a rutelor eNOS, ...) cu inducerea concomitentă a unui influx de calciu care potențează stresul celular semnificativ deja indus de soluțiile 2 și 3.

În consecință, pH-ul și potențialul redox al formulării S2 și mai ales potențialul redox al formulării S3 sunt cel mai probabil citotoxice. Ambele soluții S2 și S3 nu pot fi adecvate pentru utilizare terapeutică.

Protocolul 2 (Tabelul 8).

20 Concentrațiile de calciu în celule și plasmă sunt de ordinul a 2 până la 3 mM. Acest protocol se bazează pe utilizarea terapeutică a formulărilor.

- 1 parametru măsurat: cantitate reziduală de peroxizi (H_2O_2 , acid peracetic, interval de test Quantofix între 0 și 25 mg/L).

25 - catalizator CaCl_2 (1M, în H_2O): adăugare într-o concentrație finală de 1,25, 2,5, 10, 25 și 50 mM.

- volumul final: 1 ml = 0,950 μL de soluție testată + 0,05 μL din diluția de CaCl_2 . Factorul de diluare al soluției testate: 1.05. Concentrația finală a soluției testate 11,4 g/L (inițial 12 g/L) de marker H_2O_2 conținând 4,76 mg/L substanță activă (inițial 5,00 mg/L).

30 - cinetică: la 5 minute după adăugarea de CaCl_2 cu agitare.

Rezultate.

Tabelul 8

Test	Soluția testată	$[\text{CaCl}_2]$ Final (mM)	$[\text{peroxizi}]_{\text{final}} \text{ (mg/L)}$
1	S1	50	>>25
2	S1	25	10-25
3	S1	10	10
4	S1	2,5	5-10
5	S1	1,25	≈ 25
6	S2	2,5	>25
7	S3	2,5	>25
8	S3	1,25	≈ 25

Dezactivarea formulării S1 la 5 minute de contact cu CaCl_2 2,5 mM (concentrație fiziologică) corespunde unei scăderi a peroxidului cu un factor de 1,500 (Testul 4), adică de la 12 g/L la 8 mg/L de marker și 5,00 mg/L la 3,33 $\mu\text{g/L}$ de substanță activă.

35 Concluzii comparative privind formulările S2 și S3

Soluția S2, indiferent de metalul utilizat, nu este compatibilă cu o aplicație terapeutică, prin:

40 - pH-ul acesteia ne-tamponat pentru menținerea potențialităților sale,
 - potențialul acesteia redox citotoxic,
 - independența relativă față de cataliza calciului,
 - citotoxicitatea acesteia în condiții fiziologice datorită H_2O_2 și a acidului peracetic (în plus față de prezența ionilor Ag^+ , de exemplu, având o citotoxicitate ireversibilă),

- în condițiile experimentale utilizate, nu există o cataliză asemănătoare cu Fenton-Haber-Weiss, prin urmare nu există o producție radicală reactivă pentru utilizarea terapeutică.

Soluția S3, indiferent de metalul utilizat și de perechea de chelatare descrisă în cererea de brevet WO2010/004161, nu este compatibilă cu o aplicație terapeutică, prin:

- 5 - pH-ul acesteia nu este compatibil cu BAPTA,
- potențialul redox citotoxic al acesteia,
- independența relativă la cataliza cu calciu,
- citotoxicitatea acesteia în condiții fiziologice datorate la H_2O_2 și acidul peracetic,
- în condițiile experimentale utilizate, nu există o cataliză asemănătoare cu Fenton-Haber-Weiss, prin urmare nu există o producție radicală reactivă pentru utilizare terapeutică.

Dimpotrivă, modelul chimic de reacție al formulării S1 conform invenției este corect din cauza destabilizării sale prin calciu.

Pentru formularea S1, selecțiile:

- 15 - pH-ului,
- perechii de tamponare (adăugarea unui singur element al perechii: acid acetic, deoarece acidul peracetic este ușor produs *in situ*),
- metalului de tranziție și a valențelor sale compatibile cu reacțiile de tip Fenton-Haber-Weiss sau nu,
- perechii de agenți de chelare (compatibilitate între acestea cu $K_{dCa^{2+}}$ și K_{dMo} , $K_{dFe^{2+}/Fe^{3+}}$ într-o "cascadă"),
- penetrarea non-celulară a agenților de chelare,
- activării complexului soluției S1 prin calciu sau de alți ioni metalici existenți *in situ*, la doze fiziologice și pH (importanța selecției agenților de chelare), la un potențial redox care limitează în special oxidarea lipidelor (producția mică de Fe (III)) și generarea instantanee a radicalilor reactivi permeabili într-un interval scurt, fără acumulare, fac ca această formulare să fie compatibilă cu
- 25 utilizarea terapeutică.

Soluția S1 este foarte puternic degradată la concentrații fiziologice de calciu cu un minim la 2,5 mM. O reducere (1,25 mM) sau o creștere (de la 10 la 50 mM) a acestei concentrații non-fiziologice de calciu modifică puternic această degradare a peroxizilor datorită reacțiilor asemănătoare cu Fenton-Haber-Weiss prin înlocuirea echilibrului. Complexul chimic corespunzător soluției S1 este complet adaptat la o reacție specifică în constanta calciului în celule și plasmă.

Exemplul 13 - Exemplu de amestec activ conform invenției cu o combinație de Mo și La.

- 35 Acest exemplu de compoziție ("Amestecul 2") conform acestei invenții este realizat cu o sare de molibden și o sare de lantan. Se prepară o compoziție cu formula conform Tabelului 9, exprimată ca concentrația inițială a componentelor:

Tabelul 9

Substanțe	Amestec conform invenției
Molibdat de sodiu	20,7 μ M
Nitrat de lantan	11,5 μ M
BAPTA	42 μ M
EGTA	1051,6 μ M
H_2O_2	353 mM
CH_3COOH/CH_3COONa	70 mM
pH (by NaOH)	4,4 – 5,0
E°_{redox}	300 – 420 mV

- 40 Compoziția este denumită "inițială" deoarece corespunde concentrațiilor reactivilor adăugați fără a lua în considerare procesul catalitic utilizat.

Toate substanțele utilizate în sinteză și produsul finit sunt validate prin spectrul IR-FT.

Tabelul 10

Produs	Puritate	Formulă Moleculară	N° CAS
Molibdat de sodiu dihidrat	98-103%	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	10102-40-6
Nitrat de lantan hexahidrat	$\geq 99\%$	$La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$	10277-43-7
BAPTA: acid (1,2-bis(o-	$\geq 98\%$	$C_{22}H_{24}N_2O_{10}$	85233-19-8

aminofenoxi)etan-N,N,N',N'-tetraacetic)			
EGTA: acid (etilen glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacetic)	≥99%	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀	67-42-5
Peroxid de hidrogen	29-31%	H ₂ O ₂	722-84-1
Acid acetic glacial*	99,8-100,5%	CH ₃ COOH	64-19-7
Acetat de sodiu trihidrat	99-101%	C ₂ H ₃ NaO ₂ ·3H ₂ O	5010524
Hidroxid de sodiu	10N	NaOH	1310-73-2
Apă demineralizată	1μS	H ₂ O	7732-18-5

Substanța activă este: (MoO₄)¹⁻, Na⁺ (hidroperoxo-molibdat de lantan).

Greutate moleculară: 481,81 g/mol.

Proces de fabricație.

- 5 Procesul de fabricație este identic cu cel al Amestecului 1 din Exemplul 1, cu excepția modificărilor descrise mai jos.

- Două soluții SC sunt pregătite.

Soluția A - Na₂MoO₄·2H₂O (sursă de Mo(VI); 100%) 200 mg (final 2,4 mM)

Apă qsp 340 ml

- 10 Agitare ușoară, temperatura camerei

Soluția B - La(NO₃)₃·6H₂O (sursă de La(III); 100%) 200 mg (1,4 mM final)

Apă qsp 340 ml

Agitare ușoară, temperatura camerei.

- 15 - Soluția A (10 mL) și apoi Soluția B (10 mL) sunt introduse treptat în soluția de Si2 pentru a prepara o soluție S1 de hidroperoximolibdat de lantan.

- ETAPA (vii): Adăugarea agenților de chelare - Pregătirea unei soluții S4

Introducerea BAPTA (98,8%) 20 mg/L,

Introducerea EGTA (99,1%) 400 mg/L

- 20 - pH-ul soluției finale este ajustat prin NaOH la 4,67

- E_{redox} final este: 380 mV.

În Amestecul 2, concentrația finală de La(MoO₄)¹⁻, Na⁺ este: 20,8μM.

- 25 **Exemplul 14** - Evaluarea eficienței de oxido-reducere a invenției în complex dublu molibdat și lantanat asupra plasmăi umane.

- 30 Pentru a compara eficiența oxidativă a formulărilor (MoO₄)²⁻ (Amestecul 1) și La(MoO₄)¹⁻ (Amestecul 2) cu concentrații comparabile cu cele descrise în Fig. 3 și mai mici decât cele descrise în Fig. 5 au fost contactate cu plasmă umană timp de 2 minute. După scăderea blanku-rilor experimentale, în special în această zonă de concentrare, Amestecurile 1 și 2, conform invenției, generează o creștere a producției *in situ* de quercetină oxidată. Concentrațiile finale de MoO₄²⁻ și La(MoO₄)¹⁻ testate au fost apoi: 0,00, 3,80, 7,59, 1215 nM and 0,00, 3,25, 6,50, 1,040 nM respectiv (Fig. 8).

- 35 Diferența dintre producerea de quercetină oxidată (picul în jur de 295 nm) între cele două formulări (Amestec 1 și Amestec 2) nu este semnificativă. Eficacitatea oxidoreductivă între cele două compoziții conform invenției este comparabilă.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Bacon T.H. et al. Clin. Microbiol. Rev., no 16(1), 2003, p. 114-128

(57) Revendicări:

1. Compoziție sau amestec, terapeutic activ pentru cale topică, conținând:
 - cel puțin o sare a unui metal, metalul fiind selectat dintre molibden (Mo), wolfram (W), vanadiu (V), aur (Au), lantanidă, în particular lantan;
 - cel puțin un agent de chelare;
 - cel puțin o sursă de radicali de peroxidare;
 - cel puțin un agent tampon;
 unde amestecul sau compoziția specificată are un potențial redox de la 250 la 550 milivolți.
2. Compoziție sau amestec, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** compoziția sau amestecul menționat are un potențial redox de la 300 la 450 milivolți și chiar mai de preferință de la 300 la 420 milivolți.
3. Compoziție sau amestec, conform revendicării 1 sau 2, **caracterizată prin aceea că** metalul din metalat este de valență maximă.
4. Compoziție sau amestec, conform oricăreia din revendicările 1-3, **caracterizată prin aceea că** metalul este oxidat până la gradul său maxim de oxidare.
5. Compoziție sau amestec, conform oricăreia din revendicările 1-4, **caracterizată prin aceea că** sarea metalului este o sare a molibdenului sau conținând molibden.
6. Compoziție sau amestec, conform oricăreia din revendicările 1-5, **caracterizată prin aceea că** sarea metalului este sarea lantanidei sau conținând o lantanidă.
7. Compoziție sau amestec, conform oricăreia din revendicările 1-6, **caracterizată prin aceea că** sarea metalului este un amestec a unei sări a molibdenului și a unei sări a lantanidei.
8. Compoziție sau amestec, conform oricăreia din revendicările 1-7, **caracterizată prin aceea că** sarea molibdenului este de preferință o unitate peroxo sau hidroperoxo.
9. Compoziție sau amestec, conform oricăreia din revendicările 1-8, **caracterizată prin aceea că** substanța activă este de tipul MoO_4^{2-} sau forma sa hidroperoxo.
10. Compoziție sau amestec, conform oricăreia din revendicările 1-9, **caracterizată prin aceea că** ea include cel puțin doi agenți de chelare.
11. Compoziție sau amestec, conform oricăreia din revendicările 1-10, **caracterizată prin aceea că** agentul(agenții) de chelare are(au) cel puțin trei grupe de coordonare, de preferință grupe ale acizilor carboxilici, la trei capete ale moleculei(moleculelor) formând agentul(agenții) de chelare, grupele de coordonare menționate fiind separate printr-o catenă din cel puțin trei atomi inclusiv cel puțin un atom de azot.
12. Compoziție sau amestec, conform oricăreia din revendicările 1-11, **caracterizată prin aceea că** agentul de chelare este selectat dintre BAPTA, EGTA și orice amestecuri ai acestora.
13. Compoziție sau amestec, conform oricăreia din revendicările 1-12, **caracterizată prin aceea că** sursa principală de radicali de peroxidare este prezentă la o concentrație variind de la 200 la 600 mM, de preferință de la 300 la 500 mM și de preferință de la 340 la 450 mM.
14. Compoziție sau amestec, conform oricăreia din revendicările 1-13, **caracterizată prin aceea că** amestecul include un agent tampon permițând un pH de la 4,0 la 5,2, de preferință de la 4,4 la 5,0 de exemplu un acid carboxilic și de preferință acid acetic.
15. Compoziție sau amestec, conform oricăreia din revendicările 1-14, **caracterizată prin aceea că** amestecul are un potențial redox de la 350 la 420 milivolți.
16. Metodă de preparare a unui amestec sau a unei compoziții precum este definit, conform oricăreia din revendicările 1-15, **caracterizată prin aceea că** include (i) prepararea unei soluții tampon (ST) conținând un agent tampon având un pH acid, (ii) prepararea unei soluții a unui complex metalic (SC) conținând sarea unui oxid metalic, (iii) prepararea unei prime soluții inițiale (Si1) conținând peroxid de hidrogen, (iv) prepararea unei soluții inițiale secundare (Si2) prin amestecarea soluției ST cu soluția Si1, (v) prepararea unei soluții (S1) conținând un compus peroxo-metalic prin amestecarea soluției SC cu soluția Si2, (vi) prepararea unei soluții S2 prin ajustarea pH-ului soluției S1 cu o bază, pH-ul soluției S2 fiind mai bazic decât pH-ul soluției ST, (vii) adăugarea la soluția S2 a unui sau câțiva agenți de chelare, (viii) ajustarea opțională a pH-ului, (ix) ajustarea opțională a volumului soluției finale, obținerea unui amestec sau a unei compoziții precum este definit conform oricăreia din revendicările 1-15.
17. Metodă, conform revendicării 16, **caracterizată prin aceea că** peroxidul de hidrogen este prezent în soluția Si1 la o concentrație variind de la 200 la 600 mM, de preferință de la 300 la 500 mM și de preferință de la 330 la 460 mM.

18. Metodă, conform revendicării 16 sau 17, **caracterizată prin aceea că** agentul tampon al soluției ST este un tampon acid carboxilic/carboxilat și soluția ST are un raport de peroxid de hidrogen/carboxilat inclus între 20/1 și 1/1, și de preferință aproximativ 5/1.

19. Metodă, conform oricăreia din revendicările 16-18, **caracterizată prin aceea că** metoda include o măsurare a potențialului redox în etapele (iii) până la (ix), de preferință de asemenea include o măsurare a pH-ului în etapele (iii) până la (ix).

20. Metodă, conform oricăreia din revendicările 16-19, **caracterizată prin aceea că**, compusul peroxo-metalic al soluției S1 este un compus peroxo-molibdenic.

21. Compoziție farmaceutică sau un amestec, conținând cel puțin o sare a unui metal, metalul fiind selectat dintre molibden (Mo), wolfram (W), vanadiu (V), aur (Au), o lantanidă, în particular lantan; cel puțin un agent de chelare; cel puțin un agent tampon și o sursă de radicali de peroxidare, unde amestecul sau compoziția specificată are un potențial redox de la 250 la 550 milivolți.

22. Compoziție farmaceutică pentru uz extern, **caracterizată prin aceea că** ea include un amestec sau o compoziție terapeutic activă, având un potențial redox de la 250 până la 550 milivolți, precum este definită conform oricăreia din revendicările 1-15, sau care poate fi obținută conform unei metode precum este definită în oricare din revendicările 16-20.

23. Compoziție farmaceutică pentru uz extern, conform revendicării 21 sau 22, **caracterizată prin aceea că** include de la 0,001 la 5 mM, de preferință de la 0,01 la 2 mM, de preferință de la 0,02 la 1 mM de un amestec farmaceutic activ.

24. Compoziție farmaceutică pentru uz extern, conform oricăreia din revendicările 21-23, pentru utilizarea sa într-o metodă de tratament terapeutic a unei infecții virale, și în particular implicând un virus din familia *Herpesviridae*.

25. Compoziție farmaceutică, conform oricăreia din revendicările 21-24, pentru utilizarea sa într-o metodă de tratament terapeutic a unei infecții implicând HSV-1 și/sau HSV-2.

26. Compoziție farmaceutică, conform oricăreia din revendicările 21-24, pentru utilizarea sa într-o metodă de tratament terapeutic antiinflamator.

27. Compoziție farmaceutică, conform oricăreia din revendicările 21-26, pentru utilizarea sa într-o metodă de tratament terapeutic preventiv sau curativ.

28. Compoziție farmaceutică, având un potențial redox de la 250 până la 550 milivolți și conținând molibden, cel puțin un agent de chelare, cel puțin un agent tampon și o sursă de radicali de peroxidare pentru utilizarea sa într-o metodă de tratament terapeutic al herpesului.

29. Metodă de tratament terapeutic conținând administrarea, mai avantajos prin aplicare topică, la un subiect ce are nevoie de o cantitate terapeutic eficientă a unei compoziții farmaceutice conținând cel puțin o sare a unui metal, metalul fiind selectat dintre molibden (Mo), wolfram (W), vanadiu (V), aur (Au), o lantanidă, în particular lantan; cel puțin un agent de chelare; cel puțin un agent tampon și o sursă de radicali de peroxidare, unde compoziția are un potențial redox de la 250 până la 550 milivolți

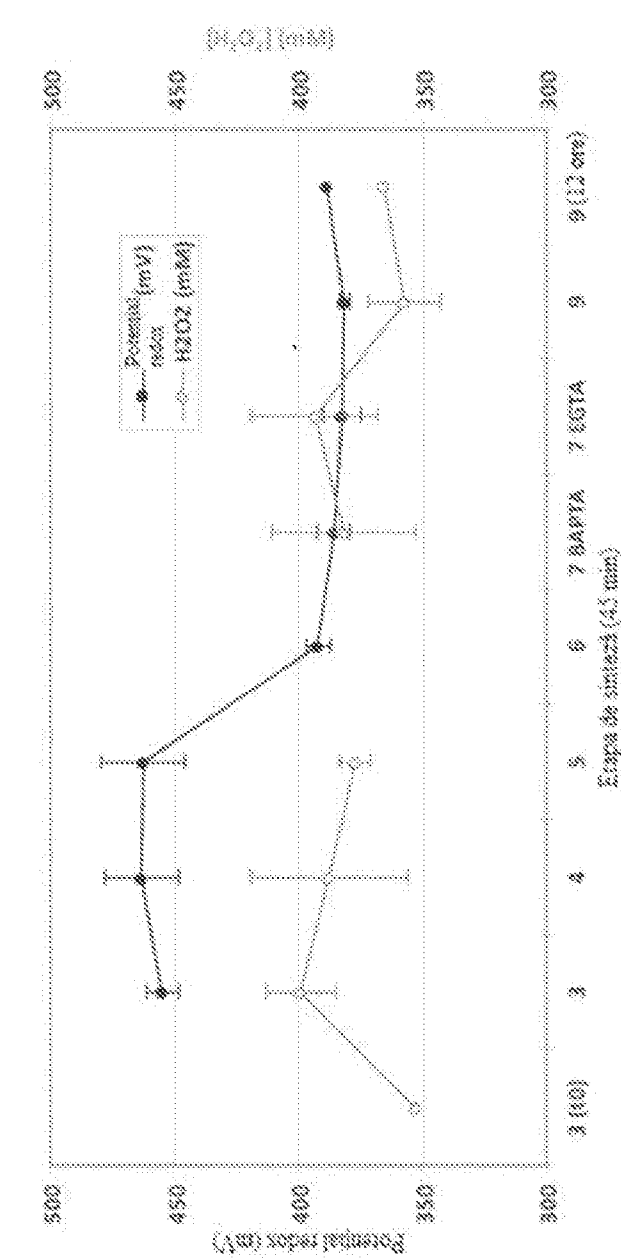


Fig. 1

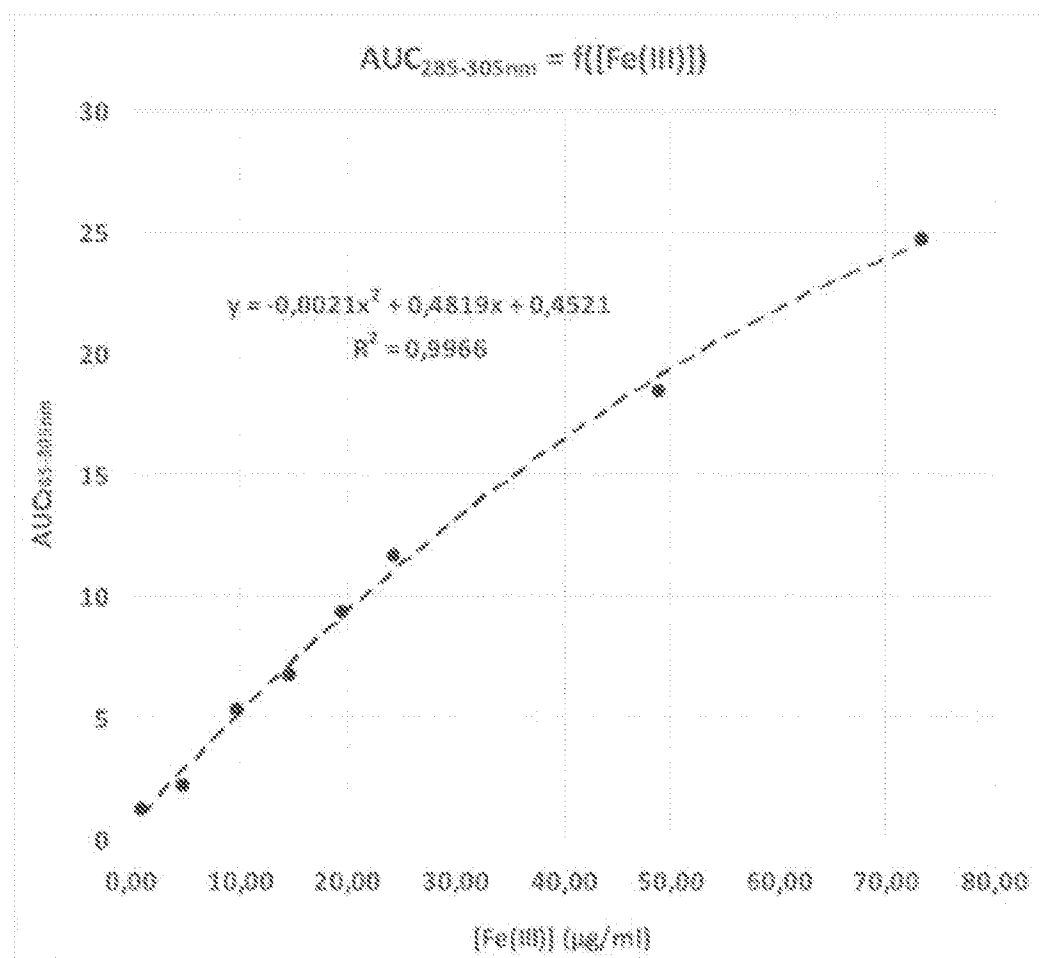


Fig. 2

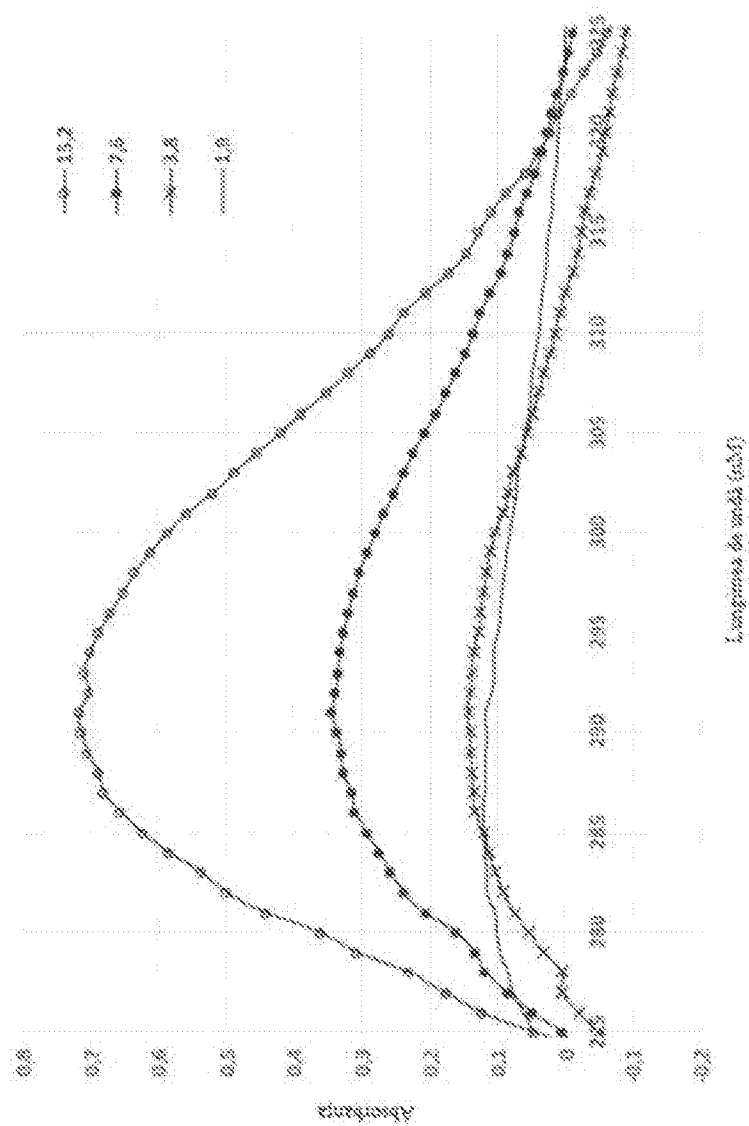


Fig. 3

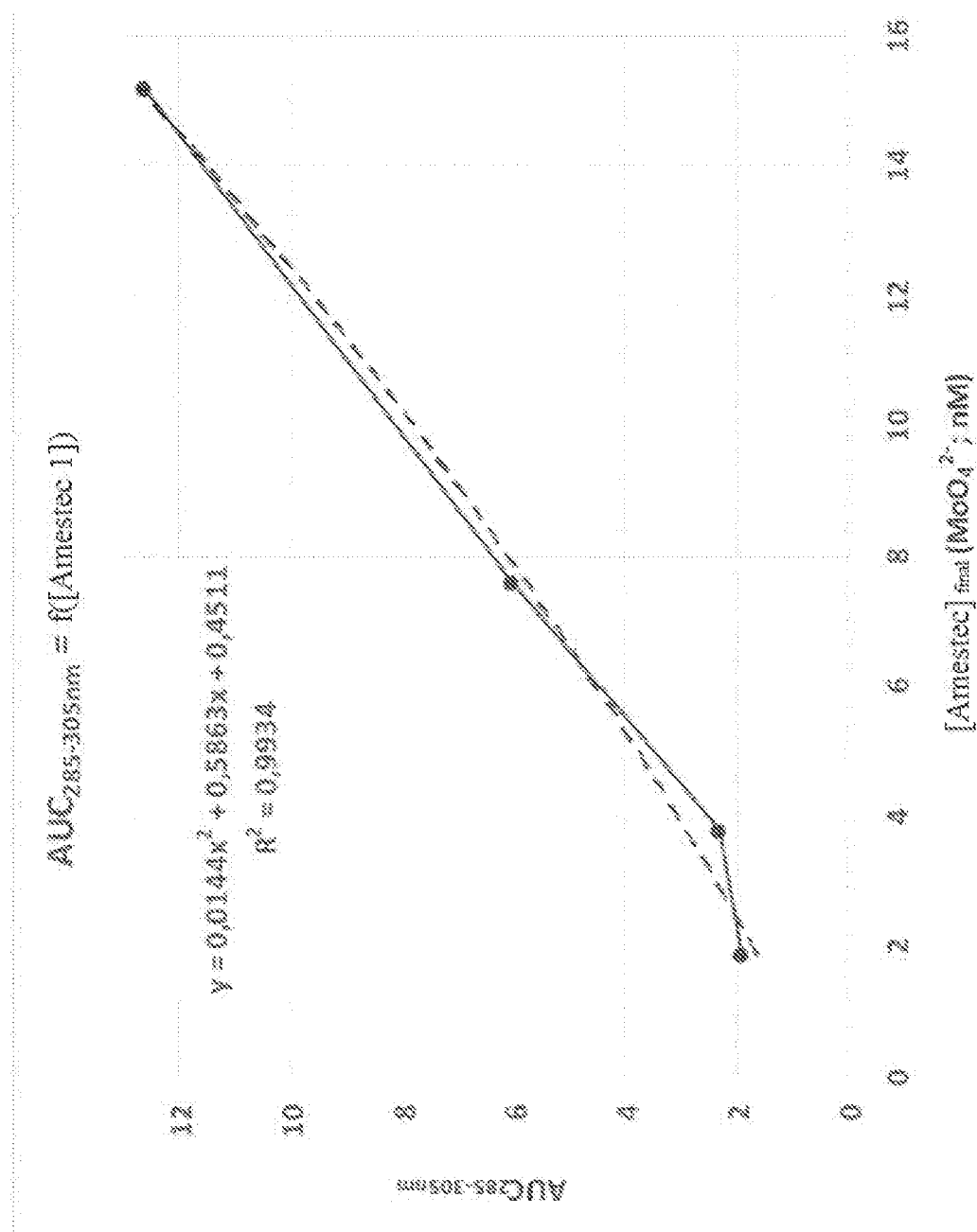


Fig. 4

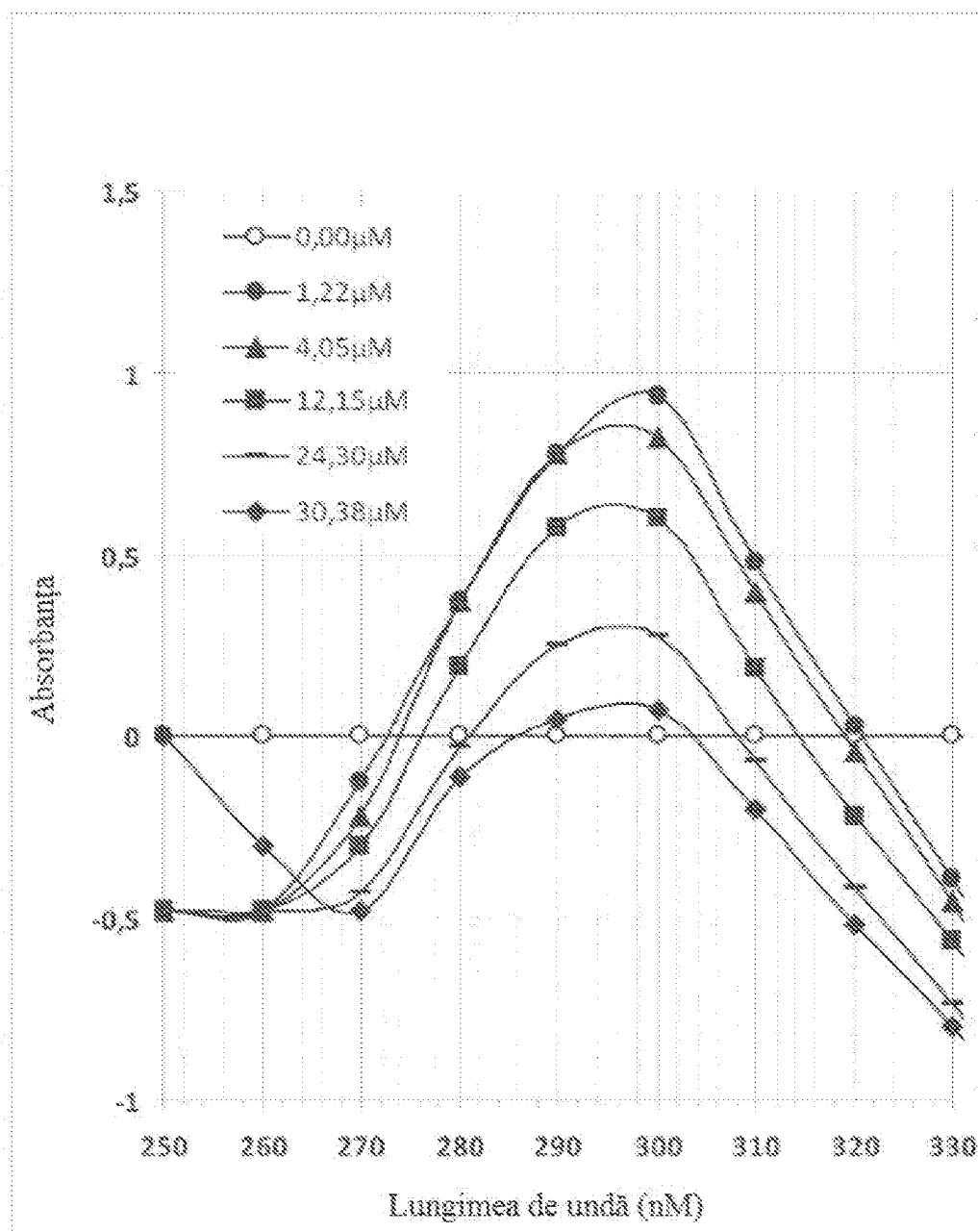


Fig. 5

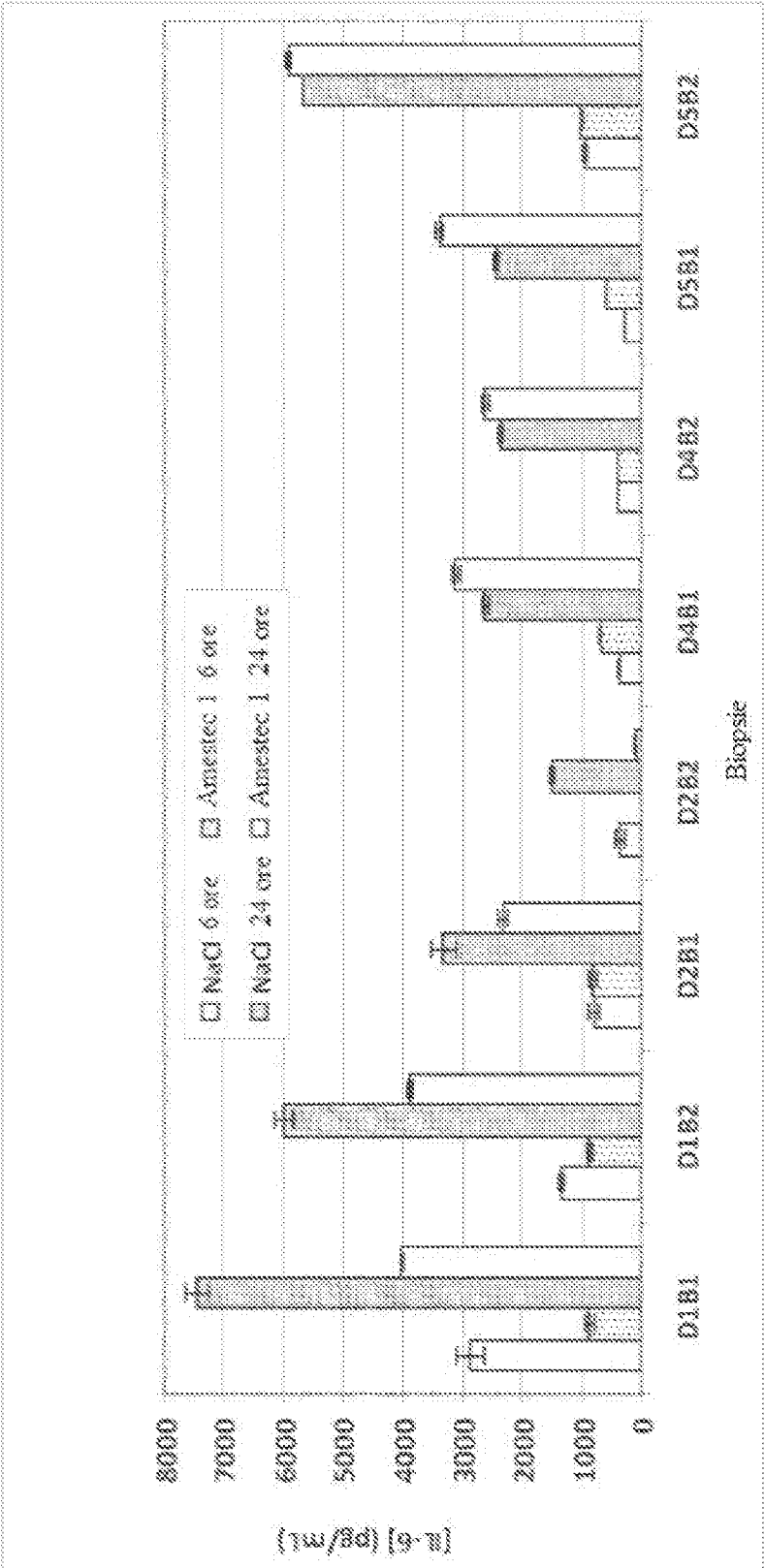


Fig. 6

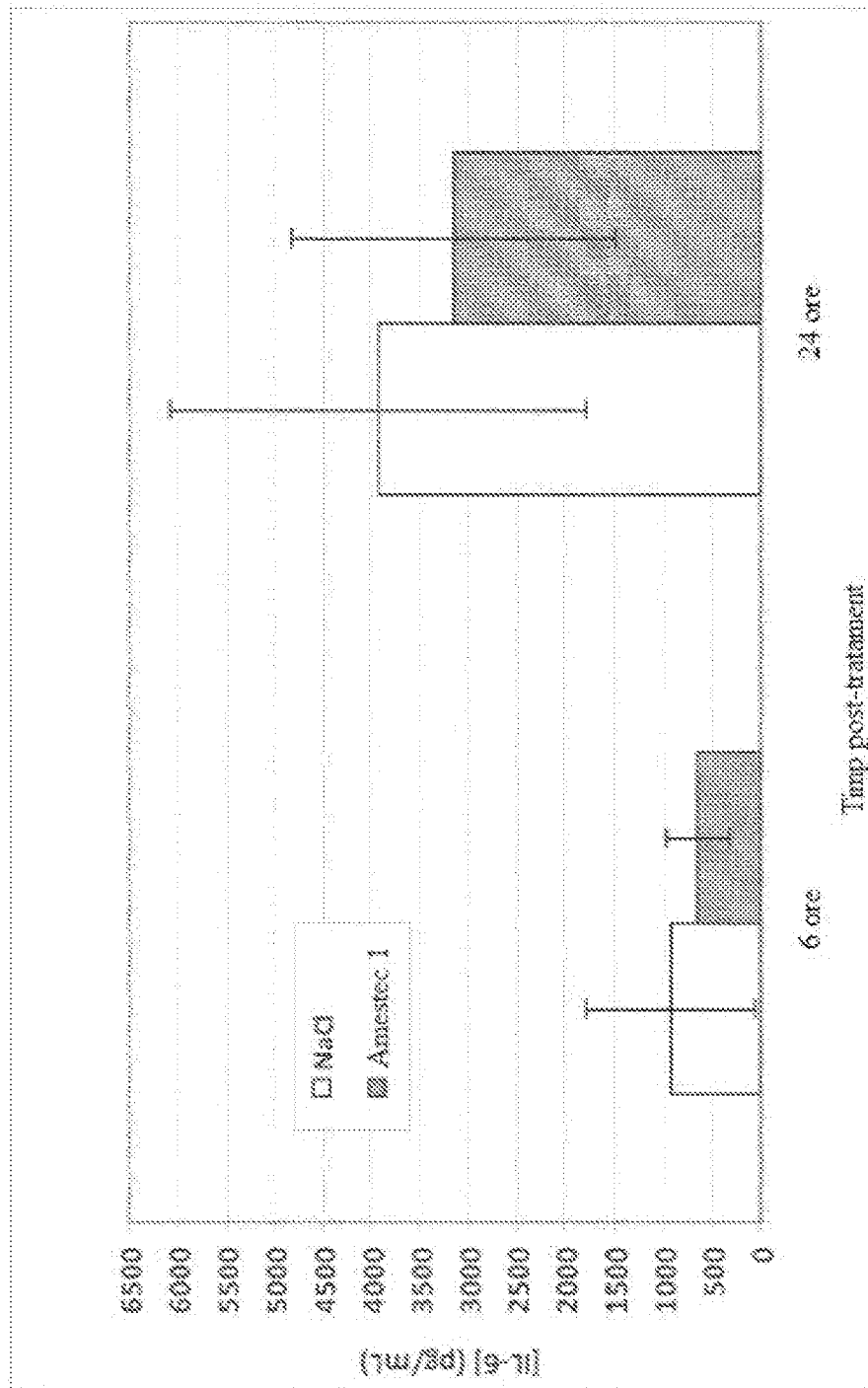


Fig. 7

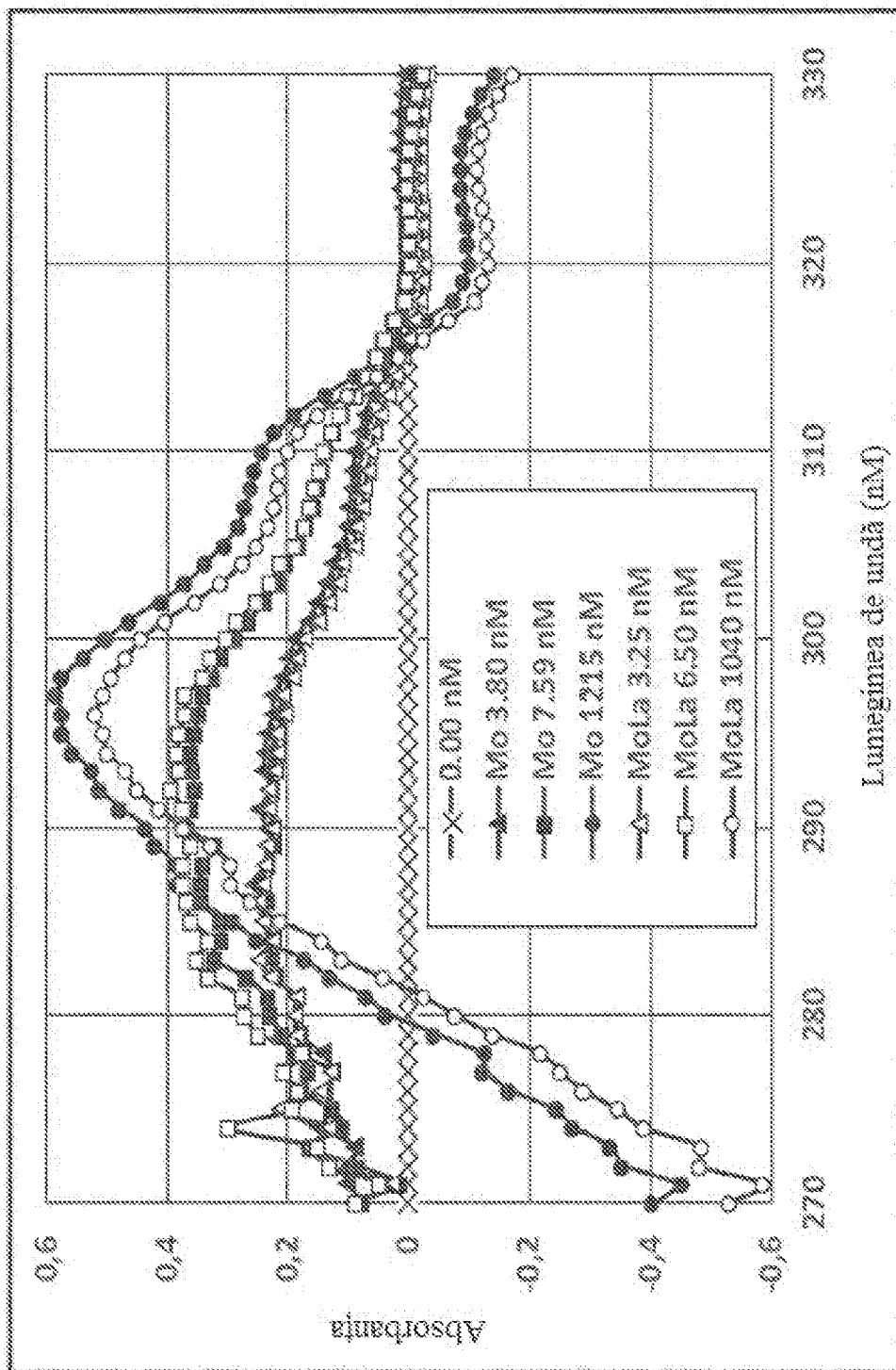


Fig. 8

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2019 0018 (32) Data de prioritate recunoscută: 2016.03.29
 (22) Data depozit: 2017.03.29 Raport de documentare internațională: ☐ da
 (67) Numărul cererii transformate și data transformării:
 (85) Data deschiderii fazei naționale: 2019.02.27
 (86) Cerere internațională: PCT/IB2017/051797, 2017.03.29
 (87) Publicarea cererii internaționale: WO 2017/168344 A1, 2017.10.05
 (71) Solicitant: **OXYMO TECHNOLOGIES INC., CA**
 (54) **Titlu: Compoziție, în particular o compoziție farmaceutică preventivă și curativă pe bază de peroxometalat**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** **A61K 9/08** (2006.01) **C11D 3/48** (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01) **A61P 31/22** (2006.01)
A61K 33/40 (2006.01) **A61P 31/12** (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stânga/dreapta): **Int.Cl:** **A61K 9/08** (2006.01) **C11D 3/48** (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01) **A61P 31/22** (2006.01)
A61K 33/40 (2006.01) **A61P 31/12** (2006.01)
Herpesviridae, peroxometalat, *Herpes simplex 1*, *Herpes simplex 2*, HSV-1, HSV-2, HHV-1, HHV-2,
"Worldwide" (Espacenet), PatSearch: **Int.Cl:** **A61K 9/08** (2006.01) **C11D 3/48** (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01) **A61P 31/22** (2006.01)
A61K 33/40 (2006.01) **A61P 31/12** (2006.01)
Herpesviridae, peroxometallate, *Herpes simplex 1*, *Herpes simplex 2*, HSV-1, HSV-2, HHV-1, HHV-2
EA, CIS (Eapatis): Int.Cl: **A61K 9/08** (2006.01) **C11D 3/48** (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01) **A61P 31/22** (2006.01)
A61K 33/40 (2006.01) **A61P 31/12** (2006.01)
Herpesviridae, пероксометаллат, *Herpes simplex 1*, *Herpes simplex 2*, HSV-1, HSV-2, HHV-1, HHV-2
SU (certificate de autor): Int.Cl: **A61K 9/08** (2006.01) **C11D 3/48** (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01) **A61P 31/22** (2006.01)
A61K 33/40 (2006.01) **A61P 31/12** (2006.01)
Herpesviridae, пероксометаллат, *Herpes simplex 1*, *Herpes simplex 2*, HSV-1, HSV-2, HHV-1, HHV-2
Patsearch –
Herpesviridae, peroxometallate, *Herpes simplex 1*, *Herpes simplex 2*, HSV-1, HSV-2, HHV-1, HHV-2

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

V. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	Bacon T.H. et al. Clin. Microbiol. Rev., no 16(1), 2003, p. 114-128	1-29
X	WO 2010004161 A2 2010.01.14	1,3-14, 16-29
X	US 2007/059255 A1 2007.03.15	1, 3-14, 16-29
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general		T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur		E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie		D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare		C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
		& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate		L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării, 2022.02.15		
Examinator, GROSU Petru		