

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038115**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|--|--|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.08 | (51) Int. Cl. <i>A61K 9/08</i> (2006.01)
<i>A61K 33/24</i> (2006.01)
<i>A61K 33/40</i> (2006.01)
<i>C11D 3/48</i> (2006.01)
<i>A61P 31/22</i> (2006.01)
<i>A61P 31/12</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
201891941 | |
| (22) Дата подачи заявки
2017.03.29 | |

(54) **ТЕРАПЕВТИЧЕСКИ АКТИВНАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ HSV-1 И/ИЛИ HSV-2, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И СПОСОБ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ HSV-1 И/ИЛИ HSV-2 С ЕЕ ПОМОЩЬЮ**

- | | |
|---|---|
| (31) 16 52697 | (56) WO-A2-2010004161
US-A1-2007059255
WO-A1-2005010774 |
| (32) 2016.03.29 | |
| (33) FR | |
| (43) 2019.04.30 | |
| (86) PCT/IB2017/051797 | |
| (87) WO 2017/168344 2017.10.05 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОКСИМО ТЕКНОЛОДЖИЗ ИНК.
(CA) | |
| (72) Изобретатель:
Вильмот Реми, Лоренцо Фредерик,
Кретьен Дени Оливье (FR) | |
| (74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU) | |

-
- (57) Изобретение относится к терапевтически активным композициям, предназначенным для терапевтического лечения инфекций HSV-1 и/или HSV-2. Например, подобная композиция может включать по меньшей мере одну соль металла, выбранного из молибдена (Mo), вольфрама (W), ванадия (V) и золота (Au), по меньшей мере один хелатирующий агент, по меньшей мере один источник пероксидирующих радикалов, по меньшей мере один буферный агент. При этом окислительно-восстановительный потенциал композиции составляет от 250 до 550 мВ. Также предложены фармацевтические композиции на основе подобной терапевтически активной композиции. Данные композиции находят применение в способе терапевтического лечения инфекций HSV-1 и/или HSV-2.

B1

038115

**038115
B1**

Настоящее изобретение относится к активной смеси для терапевтического лечения, где указанная смесь содержит пероксометаллат, например, такой как пероксомолибдат и/или, например, пероксолантанат.

В частности, настоящее изобретение относится к активной смеси для профилактического и терапевтического лечения инфекций, вызванных Herpesviridae, и, в частности, инфекций, вызванных вирусами Herpes simplex 1 (HSV-1 или HHV-1) и Herpes simplex 2 (HSV-2 или HHV-2). Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим такую активную смесь, к способам приготовления, а также к их применению, в частности, в области терапевтического лечения.

Предшествующий уровень техники

Среди инфекционных патологий заболевания, обусловленные вирусами, в дополнение к их изменчивой тяжести в зависимости от их типов, которая может варьировать вплоть до смерти пациента, и с очень неравномерной заболеваемостью в зависимости от популяций и времени, представляют собой важную терапевтическую проблему. Для этого патогена требуется метаболизм клетки-хозяина и ее компоненты, которые он использует для размножения, поэтому уничтожение патогена затруднено из-за необходимости лечения без повреждения здоровой ткани по отношению к инфицированной ткани, или даже профилактического лечения.

Среди вирусных инфекций, которые могут поражать людей, инфекции, вызванные Herpesviridae, являются распространенными, высококонтагиозными и эндемичными. Это семейство ДНК-содержащих вирусов состоит из восьми типов вирусов. Среди них HHV-1 или HSV-1 и HHV-2 или HSV-2 вызывают орофациальный-лабиальный и вагинально-анальный герпес.

Все вирусы герпеса разделяют клинические белковые и геномные структурные свойства, такие как латентность, рекуррентность или литическая активация. Как и для всех вирусных инфекций, терапевтические средства сложны и часто ограничены. Настоящее изобретение направлено на решение технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтической композиции, дающей возможность противодействия вирусной инфекции, в частности вирусной инфекции, включающей Herpesviridae, и, в частности, HSV-1 и HSV-2.

Инфекции, вызванные HSV-1 и HSV-2, являются высококонтагиозными (главным образом, при контакте) и эндемичными (Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ), январь 2016 г., "Вирус герпеса", меморандум № 400, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/fr/#>). Резервуаром является человек, без какого-либо зооноза или какого-либо вектора. Распространенность инфекций, вызванных вирусом HSV-1, ответственным за орофациальный-лабиальный герпес, определенные формы генитального герпеса и герпетической паронихии, меняется в зависимости от континентов, методов и возможностей диагностики. Она составляет в среднем от 84 до 99% в Африке, от 50 до 100% в Азии, от 65 до 98% в Европе и от 57 до 68% в Северной Америке. Распространенность инфекций, вызванных HSV-2, ответственным за генитальный и анальный герпес, меняется в зависимости от пола, социологического и этнического профиля, возраста и континента. Например (в соответствии с данными Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC), 2010, MMWR R Morb Mortal Wkly Rep., 59 (15): 456-459), серопревалентность в Соединенных Штатах в возрасте от 40 до 49 лет по оценкам составляет 32% у женщин и 20% у мужчин.

По результатам анализа уровня заболеваемости HSV-1 и HSV-2 инфекции оказывают определенное влияние во всем мире. Действительно, не существует абсолютно эффективного радикального лечения с точки зрения эрадикации патогена, независимо от того, осуществляют ли применение противовирусных препаратов пероральным или парентеральным путем, независимо от того, представляет ли это лекарственное средство аналог пирозифосфата (например, фоскарнет), аналоги неактивируемых или активируемых нуклеозидов *in situ* (например, фиацитабин, видарабин, ацикловир и его пролекарство валацикловир), или ингибитор ферментативного комплекса геликазы-праймазы (прителавир). Они способствуют снижению тяжести и частоты симптомов, но не уничтожают инфекцию. Чаще всего из-за низкой растворимости этих веществ, и в частности, представителей семейства "цикловир" (1,3 мг/мл в воде при 25°C для ацикловира), а также их ограниченной абсорбции в кишечнике (порядка 20% для ацикловира при пероральном приеме), пациенты должны принимать последующие дозы.

В отличие от офтальмологических препаратов для местного применения анти-HSV вещества, используемые в дерматологии (например, циклофосфид, ибацитабин, ацикловир), имеют клиническую эффективность, которая остается средней и непостоянной.

Кроме того, описано появление приобретенных форм резистентности у вируса простого герпеса при традиционных пероральных методах лечения или при парентеральном применении. Они чаще всего связаны с мутациями вирусного генома (Bacon T.H. et al., 2003, Clin. Microbiol. Rev., 16 (1), 114-128; Biswas S. et al., 2008, Antiviral Res., 80 (1), 81-85).

В дополнение к параметрам инфективности боли и рецидивирующему нарушению эстетичности у пациента во время вирусной реактивации эти инфекции могут осложняться тяжелыми и сложными патологиями, хотя и довольно редкими, например герпетическим энцефалитом или кератитом. Неонатальное заражение от матери связано с 60% смертностью при отсутствии лечения. Герпетические инфекции и их развитие могут быть связаны с другими патологиями из-за наличия иммунодепрессии (как индуцирован-

ной, так и патологической) или иммуносупрессии у пациента, например, такой как при определенных видах рака или после трансплантации. HSV-2 является одной из наиболее распространенных инфекций (от 60 до 90%) среди ВИЧ-инфицированных лиц. Риск заражения новой ВИЧ-инфекцией возрастает в три раза при наличии HSV-2 инфекции. У носителей обеих инфекций отмечается более высокий риск передачи ВИЧ.

Таким образом, задачей изобретения является решение технической проблемы, заключающейся в обеспечении способа получения такой фармацевтической композиции.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтически активной композиции, которая является приемлемой для местного применения.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтически активной композиции, которая легко растворяется в гидрофильных растворителях.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении активной фармацевтической композиции для трансэпидермального переноса.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтической композиции, которая является дезактивированной при проникновении через кожу.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтической композиции, биофаза которой хорошо ограничена и достижима.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтической композиции с минимальной биодоступностью.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтически активной композиции, обладающей эффектом противодействия репликации вируса, в частности HSV.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтически активной композиции, обладающей высокой цитотоксичностью для клеток, инфицированных вирусом, и, в частности, HSV.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтически активной композиции, обладающей низкой цитотоксичностью для здоровых клеток.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтически активной композиции, которая обладает профилактической эффективностью, и в частности, против HSV.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтически активной композиции, которая обладает профилактической эффективностью, особенно во время продромальной фазы инфекции, и, в частности, HSV.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтически активной композиции, которая обладает профилактической эффективностью, в частности, путем сокращения острой фазы, и, в частности, для HSV.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтически активной композиции, которая может предотвращать или ограничивать инфекционный процесс, и, в частности, для HSV.

Задача изобретения также состоит в решении технической проблемы, заключающейся в обеспечении фармацевтически активной композиции, имеющей хорошую стабильность при ее хранении при комнатной температуре и до 45°C.

Описание изобретения

Авторы изобретения обнаружили, что можно решить технические проблемы, упомянутые выше, путем получения фармацевтически или терапевтически активной смеси, содержащей по меньшей мере один пероксометаллат.

"Фармацевтически активная" означает то, что смесь или композиция обладают полезной активностью в рамках терапевтического лечения.

Термин "смесь" относится к композиции и не ограничивает состав, предназначенный для конкретного препарата или способа изготовления. Термин "смесь" в настоящей заявке обеспечивает возможность более простого отличия с семантической точки зрения "смеси" от "композиции", в частности, например, когда "смесь" интегрируют в "композицию", которая содержит другие ингредиенты.

Изобретение более конкретно относится в соответствии с первым аспектом к композиции или смеси, предпочтительно терапевтически активной при местном применении, содержащей

по меньшей мере одну соль металла, причем металл выбран из молибдена (Mo), вольфрама (W), ванадия (V), золота (Au), лантаноида, в частности лантана;

по меньшей мере один хелатирующий агент;

по меньшей мере один источник пероксидирующих радикалов;

по меньшей мере один буферный агент.

Изобретение относится предпочтительно к композиции или смеси, предпочтительно терапевтиче-

ски активной при местном применении, содержащей

по меньшей мере одну соль металла, где металл выбран из молибдена (Mo), вольфрама (W), ванадия (V), золота (Au), лантаноида, в частности лантана;

по меньшей мере один хелатирующий агент;

по меньшей мере один источник пероксидантных радикалов;

по меньшей мере один буферный агент;

где указанная смесь или композиция предпочтительно имеет окислительно-восстановительный потенциал от 250 до 550 мВ, предпочтительно от 300 до 450 мВ и более предпочтительно от 300 до 420 мВ.

Смесь в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно дает возможность получения лекарственного средства и более конкретно стабильного и активного лекарственного средства *in situ*.

Смесь в соответствии с настоящим изобретением состоит из равновесия вышеупомянутых соединений, преимущественно образующих пероксометаллический комплекс, включающий его соли. Согласно авторам изобретения, не углубляясь в какую-либо теорию, смесь в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает возможность образования сверхмолекулярной структуры типа решетки в устойчивом меняющемся равновесии, что дает возможность обеспечить на внеклеточном уровне и *in situ* катализатор для реакций, подобным реакциям Фентона и Габера-Вейса. Эти реакции называются "подобными", когда они происходят из-за металла из смеси по изобретению или другого металла, который не является железом. Часть реакционноспособных веществ, образующихся экстратемпорально активным веществом, проникает в клетку и более предпочтительно в инфицированную клетку.

В соответствии с одним вариантом осуществления композиция включает несколько солей металлов, причем металл выбран из молибдена (Mo), вольфрама (W), ванадия (V), золота (Au), лантаноида, в частности лантана.

В зависимости от способа получения соль металла представляет собой молибденовую соль или соль, содержащую молибден.

Согласно способу получения соль металла представляет собой соль лантаноида или соль, содержащую лантаноид.

Согласно способу получения соль металла представляет собой смесь молибденовой соли и лантаноидной соли.

Изобретение относится предпочтительно к композиции или смеси, предпочтительно терапевтически активной при местном применении, содержащей

по меньшей мере одну соль молибдена (Mo), при необходимости в комбинации по меньшей мере с одной солью металла, выбранного из вольфрама (W), ванадия (V), золота (Au), лантаноида, в частности лантана;

по меньшей мере один хелатирующий агент;

по меньшей мере один источник пероксидантных радикалов;

по меньшей мере один буферный агент;

где указанная смесь или композиция предпочтительно имеет окислительно-восстановительный потенциал от 250 до 550 мВ, предпочтительно от 300 до 450 мВ и более предпочтительно от 300 до 420 мВ.

Предпочтительно соль металла присутствует в виде оксида(ов) или пероксида(ов) в смеси. Предпочтительно оксиды металлов в смеси по изобретению дают возможность образования промежуточного соединения, которое представляет собой металлическую кислоту и более конкретно кислоту Льюиса.

В соответствии с альтернативным вариантом предпочтительным является соединение металла, для которого состояние окисления металла совместимо с реакцией Фентона-Габера-Вейса и реакцией, подобной реакции Фентона-Габера-Вейса (реакции окисления-восстановления, которая включает другие ионы металлов, такие как железо, которое в нашем случае является в контексте хелатирования метастабильным, т.е. преимущественно ионы переходных металлов, и в частности Mo(VI), W(IV)-(VI), V(III)-(V), Au(I)-(III)).

В соответствии с альтернативным вариантом предпочтительным является соединение лантаноида, которое может формировать полуторный оксид типа LnO_3 , для которого состояние окисления совместимо с метастабильными типами Фентона-Габера-Вейса и Фентона-Габера-Вейса-"подобными", и особенно La(III), Ce(III) и (IV), Nd(III) и (IV), Sm(III) и (IV), Gd(IV).

Предпочтительно металл из металлата или лантаната имеет максимальную валентность.

Предпочтительно металл или лантаноид окисляются до максимальной степени окисления.

В соответствии с предпочтительной альтернативой соль металла содержит молибден. Таким образом, согласно альтернативе соль металла является солью молибдена. Более конкретно смесь в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит молибдат натрия. В соответствии с изобретением предпочтительным является использование молибденовой соли, в которой валентность молибдена имеет степень VI. Эта соль выгодно дает возможность обеспечить значительную стабильность смеси композиции. Кроме того, молибден, особенно в виде соли и, например, в виде натриевой соли, с его активной валентностью (VI), его совместимой электроотрицательностью, его очень низкой цитотоксичностью, возможностью реакции Фентона-Габера-Вейса или реакции, подобной типу Фентона-Габера-Вейса, является особенно предпочтительным.

В соответствии с альтернативой образующаяся соль металла содержит пероксометаллат, и более конкретно, который может находиться в виде промежуточной гидропероксометаллатной промежуточной формы.

Предпочтительно молибденовая соль представляет собой пероксо- или гидропероксоединицу. Еще более предпочтительно активное вещество относится к типу MoO_4^{2-} или к его гидропероксоформе (см. Oyeyemi Oyeyemi F. et al., "Solution structure of molybdic acid from Raman spectroscopy and DFT analysis", *Inorganica Chimica Acta* 361 (2008) 1000-1007. Doi:10.1016/j.ica.2007.06.025); например, является промежуточным комплексом формулы типа $\text{Na}_4[\text{Mo}_2\text{O}_6 \text{ (хелатирующим)}] \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ в смеси по изобретению.

Согласно альтернативе металл и его соль представляют собой лантаноид или его соль.

В соответствии с альтернативой образующаяся соль металла содержит пероксолантанат и более конкретно вновь может находиться в виде промежуточного соединения гидропероксолантаната. Например, соль вновь может находиться в виде промежуточного комплекса формулы типа NaLn (хелатирующий) $\cdot x\text{H}_2\text{O}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ (где x и y зависят от типа лантаноида (Ln), используемого в смеси по изобретению).

Предпочтительно молибденовая и лантаноидная соль и более конкретно лантан предпочтительно представляют собой перокси- или гидроперокси единицу (см. Suponitskiy, Y.L., Proshina, O.P., Dyunin, A.G. et al. "Thermodynamic properties of lanthanum Molybdates", *Russ. J. Phys. Chem.* (2016) 90:267. Required: 10.1134/S00360244160202031X).

Предпочтительно использование соли молибдена дает возможность ограничить цитотоксичность смеси в соответствии с изобретением, в частности для эритроцитов и лимфоцитов, эпителия, фибробластов, остеобластов.

Преимущество использования молибдена заключается в его естественном присутствии в качестве кофакторов ферментов (например, таких как ксантинооксидаза, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа с ферредоксином и т.д.).

Предпочтительно использование соли лантана дает возможность ограничения цитотоксичности смеси в соответствии с изобретением.

В соответствии с предпочтительной альтернативой металл в форме его активного вещества играет роль катализатора для получения активных веществ $\text{HO}_2\cdot$ и при необходимости $\text{HO}\cdot$ и $\text{O}_2\cdot$.

В соответствии с альтернативой смесь согласно изобретению содержит от 0,1 до 500 мкМ, предпочтительно от 1 до 200 мкМ и более предпочтительно от 5 до 150 мкМ соли металла.

В соответствии с альтернативой смесь согласно изобретению содержит от 0,1 до 100 мкМ, предпочтительно от 1 до 50 мкМ и более предпочтительно от 5 до 30 мкМ металлической соли молибдена.

В соответствии с альтернативой смесь согласно изобретению содержит от 0,1 до 100 мкМ, предпочтительно от 1 до 50 мкМ и более предпочтительно от 5 до 30 мкМ металлической соли лантана.

Термины "хелатирующие агенты" (или "хелаторы") соответствуют химическим соединениям, способным формировать стабильный координационный комплекс с одним или несколькими ионами, и более конкретно с ионными формами металла, присутствующего в композиции. Металл может присутствовать в любой форме, в том числе в пероксидированной или гидропероксидированной форме. Этот комплекс считается "хелатом".

Хелатирующие агенты могут быть пригодными для смеси в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно если они должны внеклеточно катализировать, с одной стороны, продукцию *in situ* реактивных радикалов, главным образом $\text{HO}_2\cdot$, но также $\text{O}_2\cdot$ и $\text{OH}\cdot$, и обеспечивать хелатирование кальция и ионов металлов, включая ионы двухвалентного железа (Fe(II) или Fe^{2+}), и ионы трехвалентного железа (Fe(III) или Fe^{3+}), которые являются внеклеточными, связанными или свободными. Высвобождение этих реагентов является еще более эффективным, поскольку аффинность хелатов к Ca^{2+} и $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ экстрацеллюлярным ионам является значительной. Эти хелаты являются стабильными соединениями, присутствующими в фармацевтически активной смеси по изобретению, и участвуют, в дополнение к преимущественной продукции радикала $\text{HO}_2\cdot$, в фармацевтической или терапевтической активности смеси в соответствии с настоящим изобретением, особенно за счет предпочтительного хелатирования *in situ* ионов кальция и железа. Это хелатирование *in situ* также позволяет регулировать внеклеточный уровень притоков кальция в клетки, в частности, индуцированный вирусной инфекцией, с одной стороны, такой как, например, *Herpesviridae*, и с другой стороны, окислительным стрессом из-за присутствия радикалов или пероксосоединений.

Предпочтительно хелатирующие агенты не проникают в клетку и остаются внеклеточными.

В соответствии с предпочтительной альтернативой хелатирующие агенты стабилизируют пероксо- и гидропероксомолибдатные комплексы, содержащиеся в препарате. Такие пероксо- и гидропероксомолибдаты могут быть типа $(\text{Mo}_2\text{O}_6)^{4+}$ и $[\text{Mo}_4\text{O}_{12}(\text{O}_2)_2]^{4+}$.

Предпочтительно в соответствии с альтернативным вариантом хелатирующий агент позволяет стабилизировать путем хелатирования ион MoO_4^{2-} действующего вещества, который в его натриевой форме имеет молекулярную массу 205,937 г на моль, или пероксомолибдат (например, в форме $\text{MoO}_3\text{-ВАРТАН}_2^{2-}$ и/или $\text{MoO}_3\text{-ЕГТАН}_2^{2-}$).

Согласно альтернативному варианту смесь согласно изобретению содержит по меньшей мере два

хелатирующих агента.

Предпочтительно хелатирующий агент (агенты) связывается путем координации окисленного или пероксидированного металлата в растворе.

В соответствии с альтернативой хелатирующий агент образует комплекс с окисленным или пероксидированным металлатором для образования промежуточного димерного комплекса $[\text{Mo}_2\text{O}_6(\text{хелатор})]^{4+} \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ и/или формы пероксотетрамолибдата (VI) $[\text{Mo}_4\text{O}_{12}(\text{O}_2)_2]^{4+}$ -хелатор, где соль металла является солью молибдена.

В соответствии с альтернативой хелатирующий агент образует комплекс с окисленным или пероксидированным металлатором для образования комплекса $[\text{W}_2\text{O}_6(\text{хелатор})]^{4+} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, где соль металла является вольфрамовой солью.

В соответствии с альтернативой хелатирующий агент образует комплекс с окисленным или пероксидированным лантаном для формирования, в частности комплекса $[\text{La}(\text{O}_2)\text{-Хелатор}]^{2+} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, где соль лантаноида является солью лантана.

Предпочтительно хелатирующий агент совместим со стерическим захватом окисленных и/или пероксидированных комплексов металлата. Более конкретно размер его N-N "кармана", который отделяет карбоксильные остатки, включен в координацию, а также стерическое свертывание углеродной цепи этого кармана, которое должно преимущественно быть совместимым с захватом промежуточных металлаторных комплексов, особенно в окисленной пероксидированной форме. Предпочтительно хелатирующий агент совместим с электронными зарядами металлата и его внешней атомной орбитальной структурой.

В соответствии с одним аспектом хелатирующий агент (агенты) выбирают из органических поликислот и их солей, особенно аминокарбоновых поликислот. Как правило, аминокарбоновые поликислоты содержат один или несколько атомов азота аминогруппы, предпочтительно вторичный или третичный амин, связанный по меньшей мере с двумя группами карбоновой кислоты через атомы, как правило, углерод, и при необходимости атомы кислорода.

В соответствии с альтернативой хелатирующий агент (агенты), например, имеют по меньшей мере три координационные группы, предпочтительно группы карбоновых кислот, на трех концах молекулы (молекул), образующих хелатирующий агент (агенты), причем указанные координационные группы разделены цепью по меньшей мере из трех атомов, включая по меньшей мере один атом азота.

Предпочтительно хелатирующий агент (агенты) имеет пять координационных групп, предпочтительно групп карбоновых кислот, на пяти концах молекулы (молекул), образующих хелатирующий агент (агенты), причем указанные координационные группы разделены цепью по меньшей мере из шести атомов и предпочтительно девяти атомов, включая один атом азота и предпочтительно два атома азота, разделенных по меньшей мере двумя атомами.

В соответствии с альтернативой хелатирующий агент (агенты) имеет четыре координационные группы, предпочтительно группы карбоновых кислот, на четырех концах молекулы (молекул), образующих хелатирующий агент (агенты), причем указанные координационные группы разделены цепью по меньшей мере из шести атомов и предпочтительно двенадцати атомов, включая два атома азота, разделенных по меньшей мере восьмью атомами.

В соответствии с альтернативой атомы, разделяющие указанные координационные группы и/или атомы азота из хелатирующего агента (агентов), выбранные из атомов углерода, азота и кислорода. Некоторые атомы, разделяющие указанные координационные группы и/или атомы азота хелатирующего агента (агентов), могут быть включены в одно или несколько одинаковых или разных атомных колец, таких как, например, как неароматические, ароматические или гетероароматические кольца, например фенил или пиридил.

Предпочтительно хелатирующий агент выбран из группы из ВАРТА (1,2-бис-(о-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты), ЕГТА (этиленгликоль-бис-(2-аминоэтилэфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты), ДТРА (диэтилентриаминпентауксусной кислоты) и любой из их смесей.

В соответствии с альтернативой хелатирующий агент выбран из ВАРТА, ЕГТА и любой из их смесей.

Предпочтительно ВАРТА и/или ЕГТА обеспечивают лучшую стабильность предшественников, а также лучший выход синтеза.

Значения pK_a для 4 карбоксильных групп ВАРТА: pK_1 и $pK_2 < 4$ (ВАРТА нерастворима), $pK_3 = 5,47$ и $pK_4 = 6,36$; а для ЕГТА $pK_1 = 2,00$, $pK_2 = 2,65$, $pK_3 = 8,85$ и $pK_4 = 9,46$.

Предпочтительно значения pK_a хелатирующего агента(ов) совместимы с pH раствора согласно изобретению.

Предпочтительно значения pK_a хелатирующего агента(ов) являются совместимыми с pK_a металлической кислоты или надкислоты металла, промежуточно образованной в растворе согласно изобретению.

Предпочтительно значения pK_a хелатирующего агента(ов) совместимы с pH инфицированной области, например, такой как эпителий.

Предпочтительно выбранный хелатирующий агент(ы) обладает слабой цитотоксичностью. Это осо-

бенно относится к ВАРТА и ЕGТА.

Соль металла и хелатирующие агенты присутствуют в достаточном количестве и отношении для получения комплексов (пероксометаллат-хелатирующий агент(ы)).

Предпочтительно по меньшей мере один из присутствующих хелатирующих агентов имеет большую аффинность к кальцию, чем к металлу, используемому в смеси по изобретению. Это выгодно, поскольку дает возможность замещения хелатных комплексов смеси по изобретению комплексом хелатирующего агента и кальция *in vivo*. Предпочтительно концентрация хелата(ов) совместима с концентрацией внеклеточного Ca^{2+} (2-3 мМ в плазме человека), то есть хелатирующий агент (агенты), присутствующий в смеси по изобретению, находится в достаточных количествах для эффективного формирования комплекса, с терапевтической точки зрения, с присутствующим количеством внеклеточного кальция.

Предпочтительно присутствующий хелат(ы) имеют большую аффинность к железу ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$), чем к металлу, используемому в смеси по изобретению. Это выгодно позволяет замещать хелатные комплексы смеси по изобретению комплексом хелатирующего агента - $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ *in vivo*.

Согласно альтернативе смесь в соответствии с изобретением содержит от 0,0001 до 1 мМ хелатирующих агентов.

Согласно альтернативе смесь в соответствии с изобретением содержит от 0,1 до 100 мкМ, предпочтительно от 1 до 50 мкМ и более предпочтительно от 5 до 20 мкМ ВАРТА. Согласно варианту смесь в соответствии с изобретением включает от 1 до 80 мкМ и предпочтительно от 20 до 80 мкМ ВАРТА.

Согласно другому варианту смесь по изобретению содержит от 0,1 до 1 мМ, предпочтительно от 50 до 800 мкМ и более предпочтительно от 200 до 700 мкМ ЕGТА. Согласно варианту смесь по изобретению включает от 200 до 2000 мкМ и предпочтительно от 600 до 1400 мкМ ЕGТА.

Согласно другому варианту смесь по изобретению содержит ВАРТА и ЕGТА, присутствующие в концентрациях от 0,0001 до 1 мМ, и предпочтительно от 5 до 20 мкМ и от 200 до 700 мкМ соответственно.

Согласно альтернативе молибденовая соль и хелатирующие агенты присутствуют в отношении от 10/1 до 1/100 (отношении соль молибдена/хелатирующий агент, выраженном в молярных концентрациях).

Согласно альтернативе соль лантана и хелатирующие агенты присутствуют в отношении от 10/1 до 1/100 (отношении соль La/ хелатирующий агент, выраженном в молярных концентрациях).

Согласно альтернативе молибденовая соль и ВАРТА присутствуют в отношении от 3/1 до 1/10, выраженном в молярных концентрациях.

Согласно альтернативе молибденовая соль и ЕGТА присутствуют в отношении от 1/10 до 1/70, выраженном в молярных концентрациях.

Согласно альтернативе соль лантана и ВАРТА присутствуют в отношении от 3/1 до 1/10, выраженном в молярных концентрациях.

Согласно альтернативе соль лантана и ЕGТА присутствуют в отношении от 1/10 до 1/70, выраженном в молярных концентрациях.

Согласно альтернативе источником радикалов является в основном H_2O_2 .

Согласно альтернативе один или несколько вторичных источников радикалов могут быть добавлены или синтезированы в меньшинстве *in situ*.

Согласно альтернативе H_2O_2 представляет собой водный раствор, содержащий H_2O_2 в объеме 1:10 или 30% или 8,82 М.

Предпочтительно источник H_2O_2 не содержит какого-либо стабилизатора, выбранного из: пиридин-карбоновых кислот, например, таких как пиколиновая кислота; фосфоновой и аминофосфоновой кислот; замещенных амидов или аминов; алкилсульфоновых кислот и их смесей.

Согласно альтернативе основным источником пероксилирующих радикалов является перекись водорода. Таким образом, согласно этой альтернативе перекись водорода присутствует в концентрации от 200 до 600 мМ, предпочтительно от 300 до 500 мМ и более предпочтительно от 340 до 450 мМ.

В соответствии с альтернативой смесь согласно изобретению содержит долю перекиси водорода в диапазоне от 30 мМ до 4,4 М, предпочтительно от 150 мМ до 3 М, предпочтительно от 235 мМ до 1,8 М и более предпочтительно от 260 до 440 мМ. Согласно альтернативе смесь по изобретению не включает какого-либо дополнительного добавления перкислоты.

Предпочтительно количество (или концентрацию) перекиси водорода (H_2O_2) анализируют титрованием. Как правило, можно использовать анализ с помощью раствора перманганата калия.

Концентрацию перекиси водорода можно также анализировать с помощью УФ-спектроскопии.

Предпочтительно буферный агент используют для специфического контроля рН смеси в соответствии с изобретением.

Предпочтительно буферный агент используют для специфического контроля рН во время нанесения *in situ* раствора в соответствии с изобретением.

Из буферных агентов предпочтительной является карбоновая кислота.

Предпочтительно буферный агент не включает следующие кислоты: гидроксидированные карбоновые кислоты (например, яблочную кислоту) или поликарбоновые кислоты (например, лимонную и изо-

лимонную кислоты, малоновую кислоту); карбоновые кислоты с молекулярной массой более 100 г/моль, и в частности, длинноцепочечные карбоновые кислоты (более C_6) из-за возможности индукции дестабилизации клеточных мембран, а также ненасыщенные алифатические карбоновые кислоты (например, сорбиновую кислоту), из-за их возможности перекисного окисления алкенового типа, которое является цитотоксичным.

В соответствии с альтернативой настоящее изобретение включает присутствие определенных кислот, образующихся *in situ* во время синтеза, предпочтительно в небольшом количестве (например, таких как перуксусная кислота). Они используются в качестве вспомогательного источника радикалов при осуществлении изобретения и терапевтическом использовании изобретения.

В соответствии с альтернативой предпочтительным является буферный агент, имеющий рКа при физиологическом значении рН (на коже и слизистой оболочке), т.е. рН, например, составляющий от 4,4 до 5,0 и совместимый с рКа окисленной и/или пероксидированной металлической кислоты, форма которой является ионизированной (например, MoO_4H_2 , $pK_1=3,61$ и $pK_2=3,89$).

Предпочтительно буферный агент присутствует в смеси по изобретению при концентрации от 1 до 500 мМ, предпочтительно от 10 до 200 мМ, более предпочтительно от 50 до 100 мМ.

Отношение молярных концентраций перекиси водорода и буферного агента составляет от 2 до 9 и предпочтительно от 3 до 8.

Предпочтительно в смесь добавляют буфер, чтобы получить рН от 4,4 до 5,0, который является пригодным (i) для контакта по изобретению с кожей и слизистыми оболочками, (ii) для стабильности активного вещества MoO_4^{2-} в присутствии H_2O_2 , (iii) для каталитической реакции Фентона-Габера-Вейса или подобной и (iv) для продукции *in situ* разновидностей радикалов, в основном типа НОО.

В соответствии с альтернативой смесь содержит в качестве буферного агента, обеспечивающего рН от 4,0 до 5,2, предпочтительно от 4,4 до 5,0, например карбоновую кислоту и предпочтительно уксусную кислоту.

Предпочтительно смесь имеет окислительно-восстановительный потенциал от 350 до 450 мВ и предпочтительно от 350 до 420 мВ.

Окислительно-восстановительная эффективность смеси по изобретению также может быть оценена по окислению *in vitro* кверцетина ионами трехвалентного железа (III) или Fe^{3+} . В частности, для этого можно использовать так называемый "кверцетиновый метод" (адаптированный, например, из исследований El Hajji H. et al. (2006) "Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation", *Free Radic. Res.*, 40(3), 303-320 и Balcerzak M. et al. (2008) "Selective determination of Fe(III) in Fe(II) samples by UV-spectrophotometry with the aid of quercetin and morin", *Acta Pharm.*, 58, 327-334).

Настоящее изобретение также относится к способу получения смеси, как определено в соответствии с настоящим изобретением. Более конкретно настоящее изобретение относится к способу получения смеси в соответствии с изобретением, включающему (i) получение буферного раствора (BS), содержащего буферный агент, имеющий кислый рН; (ii) получение раствора металлического комплекса (CS), содержащего соль оксида металла; (iii) получение первого исходного раствора (Si1), содержащего перекись водорода; (iv) получение второго исходного раствора (Si2) путем смешивания раствора BS с раствором Si1; (v) получение раствора (S1), содержащего пероксометаллическое соединение, путем смешивания раствора CS с раствором Si2; (vi) получение раствора S2 путем регулирования рН раствора S1 основанием, где рН раствора S2 является более основным, чем рН раствора BS; (vii) добавление к раствору S2 одного или нескольких хелатирующих агентов; (viii) необязательную регуляцию рН; (ix) необязательную регуляцию объема конечного раствора, получение фармацевтически активной смеси, как определено в соответствии с изобретением.

В зависимости от варианта, когда используют две или более соли оксида металла, с различными оксидами металлов, получение раствора металлического комплекса (SC) может состоять из получения отдельных растворов для каждой соли оксида металла и последующего смешивания этих растворов одновременно или последовательно с раствором Si2 для получения раствора S1.

Предпочтительно получение смеси в соответствии с настоящим изобретением достигается в соответствии с методом каталитического синтеза. Каталитический синтез смеси в соответствии с изобретением обычно является последовательным. Преимущественно способ согласно изобретению включает последовательность этапов (iii)→(iv)→(v)→(vi)→(vii)→(viii)→(ix).

Предпочтительно способ получения включает последующий спектральный анализ (например, путем анализа ПК, УФ и/или видимых спектров) на одном или нескольких этапах приготовления и предпочтительно на всех этапах приготовления.

Согласно альтернативе первый исходный раствор Si1 имеет первый окислительно-восстановительный потенциал, превышающий окислительно-восстановительный потенциал смеси в соответствии с изобретением.

Предпочтительно после этапа (ix) не проводят разбавления объема смеси, чтобы избежать смещений химических равновесий смеси в соответствии с настоящим изобретением.

Конечно, предпочтительно использовать вещества или соединения с достаточно удовлетворительной чистотой в качестве сырья. В частности, необходимо, чтобы различные вещества или соединения

были пригодны для терапевтического применения.

В соответствии с альтернативой можно провести ИК-Фурье спектроскопию, ЯМР-Н и/или масс-спектрометрию полученной смеси в соответствии с изобретением, чтобы убедиться в соответствии состава смеси промышленным требованиям, и в особенности для фармацевтического терапевтического применения. Также предпочтительно проводить ИК-Фурье спектроскопию для компонентов-предшественников смеси по изобретению.

В соответствии с альтернативой рН можно контролировать на одном или нескольких или даже на всех этапах приготовления.

Согласно альтернативе окислительно-восстановительный потенциал можно контролировать на одном или нескольких или даже на всех этапах приготовления.

В соответствии с альтернативой смесь по изобретению можно контролировать методом денситометрии и/или УФ-спектрофотометрии на одном или нескольких или даже на всех этапах приготовления.

В соответствии с альтернативой можно проанализировать окислительно-восстановительную эффективность смеси по изобретению с помощью кверцетинового метода (УФ-спектрофотометрического анализа окисления *in vitro* кверцетина с помощью Fe^{3+} , присутствующего или полученного *in vitro*).

Предпочтительно перекись водорода присутствует в растворе Si1 в концентрации от 200 до 600 мМ, предпочтительно от 300 до 500 мМ и более предпочтительно от 330 до 460 мМ.

Согласно варианту осуществления используемый материал представляет собой металл и предпочтительно из нержавеющей стали, при необходимости пассивированного металла.

Согласно варианту осуществления материал может быть повторно пассивирован при приготовлении смеси по изобретению, например, путем помещения материала (который будет контактировать со смесью или ее предшественниками) в контакт с раствором перекиси водорода.

Предпочтительно проводить анализ источника перекиси водорода, чтобы обеспечить количество присутствующей перекиси водорода и ввести ее в действие при приготовлении смеси по изобретению. Этот анализ может быть проведен, например, путем титрования или с помощью УФ-спектрофотометрии (обычно при 240 нм).

Предпочтительно рН буферного раствора BS составляет от 4,4 до 5,0 и предпочтительно от 4,7 до 4,8.

Предпочтительно буферный агент BS раствора представляет собой буфер карбоновой кислоты/карбоксилата, а раствор BS имеет отношение перекись водорода/карбоксилат от 20/1 до 1/1 и предпочтительно около 5/1.

Предпочтительно отношение уксусной кислоты (AcOH) и ее добавленной ацетатной соли в предельном количестве позволяет получить наименьшую продукцию перуксусной кислоты (AcOOH). Предпочтительно в способе получения согласно изобретению продукция перуксусной кислоты является минимальной, и ее каталитическое воздействие очень мало.

Получение первого исходного раствора Si1 включает получение водного раствора карбоновой кислоты и предпочтительно уксусной кислоты, а затем добавление перекиси водорода.

Предпочтительно первый исходный раствор Si1 имеет рН от 2,5 до 4,6 и предпочтительно от 2,7 до 4,2. Предпочтительно первый исходный раствор Si1 имеет окислительно-восстановительный потенциал от 400 до 550 мВ и предпочтительно от 420 до 500 мВ.

Предпочтительно способ включает измерение окислительно-восстановительного потенциала на этапах (iii)-(ix) и предпочтительно также включает измерение рН на этапах (iii)-(ix).

В соответствии с альтернативой второй исходный раствор Si2 имеет рН от 2,5 до 3,2 и предпочтительно около 2,9. Согласно альтернативе исходный раствор Si2 имеет окислительно-восстановительный потенциал, превышающий окислительно-восстановительный потенциал первого исходного раствора Si1. Окислительно-восстановительный потенциал второго исходного раствора Si2 может составлять от 420 до 570 мВ и предпочтительно от 440 до 520 мВ.

В соответствии с альтернативой буферный раствор BS вводят в первый исходный раствор Si1.

Согласно одному варианту осуществления концентрация перекиси водорода во втором исходном растворе Si2 составляет от 300 до 500 мМ и предпочтительно от 260 до 440 мМ.

Предпочтительно на этапе (iv) рН поддерживают ниже допустимого предела рН для реакции каталитического синтеза для смеси согласно изобретению. Буферный агент предпочтительно используют на этапе (iv).

Предпочтительно на этапе (iv) генерированная продукция *in situ* перуксусной кислоты является минимальной.

Предпочтительно на этапе (iv) окислительно-восстановительный потенциал раствора Si1 на этапе (iii) повышают, например, путем перехода от значения от 440-460 мВ до значения 460-480 мВ с этапа (iv).

Отслеживая концентрацию перекиси водорода, присутствующей во время приготовления смеси по изобретению, продукцию перекиси наблюдают во время ее введения, то есть введения перекиси водорода в контакт с буферным раствором (этап (iv)). Предпочтительно добавление перекиси водорода осуществляют в водном растворе, предварительно забуференном до кислого рН. Таким образом, для получения

первого исходного раствора S11 перекись водорода добавляют в раствор с кислым значением pH и, например, с pH от 2,7 до 4,2.

Предпочтительно этап (iv) приводит к смещению равновесия в сторону продукции *in situ* H_2O_2 с разрушением по возможности генерированной перуксусной кислоты при химическом равновесии.

В соответствии с альтернативой буферный раствор CS вводят в раствор S1.

В соответствии с альтернативой раствор S1, содержащий пероксометаллический комплекс, имеет pH от 2,5 до 3,5 и предпочтительно от 2,8 до 3,0.

В соответствии с вариантом осуществления окислительно-восстановительный потенциал раствора S1, содержащий пероксометаллический комплекс, составляет от 400 до 550 мВ и предпочтительно от 440 до 500 мВ.

Согласно одному варианту осуществления концентрация перекиси водорода в растворе S1, содержащем пероксометаллический комплекс, составляет от 250 до 500 мМ и предпочтительно от 320 до 450 мМ.

На этапе (v) добавленная соль молибдата находится в форме молибденовой кислоты $MoO_3 \cdot H_2O$ и $MoO_3 \cdot 2H_2O$.

В условиях, не соответствующих изобретению, синтез при равновесии активного вещества MoO_4^{2-} при комнатной температуре без какого-либо катализатора и без добавления какой-либо сильной кислоты (например, H_2SO_4) потребовал бы нескольких дней.

Согласно варианту осуществления pH раствора S2 доводят с помощью буфера до значения, предпочтительно составляющего от 4,4 до 5,0 и например от 4,5 до 5,0. Предпочтительно при этом забуференном значении pH преобладает нестабильная форма MoO_4^{2-} (состояние окисления Mo(VI)), и перекись водорода является стабилизированной. Перекись водорода часто промышленно стабилизируют фосфатным буфером. Может формироваться нестабильное промежуточное соединение фосфомолибдата (желтое), которое исчезает при равновесии, делая H_2O_2 более реакционноспособным.

Согласно альтернативе окислительно-восстановительный потенциал раствора S2 составляет от 300 до 450 мВ и предпочтительно от 360 до 410 мВ.

Оксиды молибдена Mo(VI) в водном растворе и при pH для синтеза смеси по изобретению могут существовать в разных молекулярных структурах: MoO_4^{2-} и $[MoO_6^{2-}]$, $[Mo_2O_3(O_2)_4(H_2O)_2]^{2-}$, а также в реакционных многоядерных формах (таких как двуядерные комплексные структуры оксо-Mo(VI) (Dement'ev L.A. et al. (2007) "Mononuclear, polynuclear and cluster complexes of molybdenum and their reactions as models of biochemical systems and processes", Russ. J. Gen. Chem., 77(5), 822-843)).

Предпочтительно условия получения обеспечивают формирование *in situ* пероксо- и гидропероксо-молибдата, когда солью металла является соль молибдена. Последняя относится к типу: $[Mo_2O_3(O_2)_4(H_2O)_2]^{2-}$. Согласно альтернативе предпочтительным является молярный избыток перекиси водорода более 1000 раз и соли металла, и в частности, более 10000 раз и более предпочтительно в 15000 раз относительно Mo (VI).

Предпочтительно хелатирующий агент (агенты), а также pH синтеза ограничивают смещения реакции типа "восстановителя Джонса", состоящей в восстановлении иона металлата, т.е. преимущественно молибдата, до состояния низкого окисления, соответствующего металлическому молибдену. Согласно альтернативе это смещение ограничено в слабокислой водной среде, обычно с pH, составляющим от 4,4 до 5,0 и, например, от 4,5 до 4,7.

Предпочтительно, когда присутствуют несколько хелатирующих агентов, готовят независимые растворы хелатирующих агентов, причем каждый раствор содержит специфический хелатирующий агент.

Согласно предпочтительной альтернативе добавление хелатирующих агентов достигают в порядке повышения pKa.

Например, можно приготовить раствор, включающий хелатирующий агент типа ВАРТА, с одной стороны, и раствор хелатирующего агента типа EGTA, с другой стороны. Предпочтительно добавляют ВАРТА, а затем EGTA.

Предпочтительно хелатирующий агент(ы) дает возможность проведения *in situ*, то есть особенно после местного применения, реакции Фентона-Габера-Вейса, особенно с константой диссоциации $Kd_{\text{хелата}}: Fe^{2+}/Fe^{3+} > Ca^{2+}$.

Предпочтительно хелатирующий агент(ы) внеклеточно обеспечивает *in situ* автономность продукции реактивных радикалов, в основном HO_2^{\bullet} и в меньшей степени O_2^{\bullet} и HO^{\bullet} .

Согласно альтернативе сначала можно добавить ВАРТА в раствор S2, чтобы получить итоговый раствор S3. Раствор S3, например, имеет pH от 4,0 до 5,0 и предпочтительно от 4,3 до 4,8. Например, раствор S3 имеет окислительно-восстановительный потенциал, по существу, идентичный потенциалу раствора S2. Другими словами, окислительно-восстановительный потенциал не меняется при добавлении хелатирующего агента типа ВАРТА. Согласно альтернативе окислительно-восстановительный потенциал раствора S3 составляет от 250 до 450 мВ и предпочтительно от 300 до 400 мВ. Предпочтительно предварительное растворение ВАРТА в небольшом объеме раствора S2 осуществляют до того, как он вступит в контакт с остальной частью раствора S2.

Предпочтительно концентрация ВАРТА находится в молярном отношении от 1/1 до 1/3 и предпочтительно 1/2 относительно молибденовой соли.

Например, раствор S3 имеет концентрацию перекиси водорода от 250 до 500 мМ и предпочтительно от 320 до 440 мМ.

Предпочтительно, чтобы получить итоговый раствор S4, можно добавить по меньшей мере один другой хелатирующий агент типа EGTA в раствор S3. В соответствии с альтернативой раствор S4 имеет рН от 4,0 до 5,0 и предпочтительно от 4,3 до 4,7.

Согласно альтернативному варианту окислительно-восстановительный потенциал раствора составляет от 300 до 400 мВ и предпочтительно от 350 до 390 мВ.

Предпочтительно концентрация EGTA находится в молярном отношении от 10/1 до 50/1 и предпочтительно около 25/1 относительно соли молибдена.

Например, раствор S4 имеет концентрацию перекиси водорода от 250 до 550 мМ и предпочтительно от 320 до 470 мМ.

В соответствии с альтернативой рН на этапе (viii) регулируют с помощью основного раствора, например, типа гидроксида натрия, предпочтительно концентрированного, например, до концентрации от 8 до 15 М. Предпочтительно рН на этап (viii) может быть скорректирован до значения от 4,4 до 5,0 и предпочтительно около 4,6.

Согласно альтернативе рН смеси по изобретению составляет от 4,50 до 4,70. Предпочтительно окислительно-восстановительный потенциал смеси по изобретению находится в диапазоне от 320 до 390 мВ.

В соответствии с предпочтительной альтернативой способ включает снижение окислительно-восстановительного потенциала на этапе (vi). Уменьшение окислительно-восстановительного потенциала может составлять, например, от 50 до 150 мВ и обычно составляет около 90 мВ.

Предпочтительно окислительно-восстановительный потенциал является, по существу, постоянным после уменьшения окислительно-восстановительного потенциала на этапе (vi).

Предпочтительно смесь в соответствии с настоящим изобретением является стабильной в течение времени хранения, например, при комнатной температуре или до температуры 45°C в течение шести месяцев. Рекомендуется хранить смесь в темноте и защищая от воздействия влаги.

Величину рН измеряют с помощью калиброванного рН-метра и с компенсацией температуры, с комбинированным электродом KCl 4М/AgCl.

Окислительно-восстановительный потенциал измеряют комбинированным рН-метром/ОВП-метром, оснащенный откалиброванным платиновым/каломельным электродом. Как правило, это измерение проводят при комнатной температуре, то есть при 20°C и при атмосферном давлении, то есть 101325 Па.

Концентрацию перекиси водорода предпочтительно оценивают в вышеупомянутых растворах с помощью УФ-спектроскопии в соответствии с уравнением, полученным из закона Бера-Ламберта: $A_{240\text{нм}} = 43,6 \times 1 \times [\text{H}_2\text{O}_2]$ с 1 в сантиметрах и $[\text{H}_2\text{O}_2]$ в молях (Noble R.W. et al. (1970) "The reaction of ferrous horseradish peroxidase with hydrogen peroxide", J. Biol. Chem., 245(9), 2409-2413).

В соответствии с конкретной альтернативой соединение пероксометалла из раствора S1 представляет собой пероксомолибденовое соединение.

Таким образом, смесь по изобретению содержит в соответствии с этой альтернативой пероксометаллическое соединение. Согласно предпочтительному варианту смесь по изобретению содержит комплекс пероксомолибдена.

В соответствии с альтернативой раствор содержит молибдат натрия в форме Mo(VI). Предпочтительно при рН растворов по изобретению соль находится, главным образом, в каталитической форме $\text{MoO}_3\text{-ВАРТА}^{3-}$ и, главным образом, $\text{MoO}_3\text{-EGTA}^{3-}$, для обоих источников активного вещества MoO_4^{2-} .

В соответствии с конкретным вариантом осуществления смесь в соответствии с изобретением содержит соль молибдена, предпочтительно натриевую, смесь двух хелатирующих агентов, предпочтительно типа ВАРТА и EGTA, перекись водорода и ацетатный буферный агент (например, уксусную кислоту/натрия ацетат).

В соответствии со специфической альтернативой смесь в соответствии с настоящим изобретением включает

молибдатную соль, например натрия молибдат;

ВАРТА;

EGTA;

H_2O_2 ;

$\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$;

$E_{\text{о/н}}$ от 250 до 550 мВ, предпочтительно от 300 до 450 мВ и также предпочтительно от 300 до 420 мВ;

рН 4,4-5,0.

В соответствии со специфическим вариантом смесь в соответствии с настоящим изобретением включает

молибдатную соль, например натрия молибдат;
лантановую соль, например лантана нитрат;
ВАРТА;
EGTA;
H₂O₂;
CH₃COOH/CH₃COONa;
E_{0/в} от 250 до 550 мВ, предпочтительно от 300 до 450 мВ и также предпочтительно от 300 до 420 мВ;
рН 4,4-5,0.

Предпочтительно соединения из смеси находятся в требуемых количествах и условиях рН и условиях окислительно-восстановительного потенциала для образования комплекса пероксомолибдата или комплекса гидропероксомолибдата, где молибден имеет валентность VI.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления смесь по изобретению содержит по меньшей мере один хелатирующий агент и в лучшем случае и по меньшей мере два хелатирующих агента и предпочтительно в концентрации от 5 до 20 мкМ и от 200 до 700 мкМ соответственно.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления смесь по изобретению содержит от 340 до 450 мМ основного донора радикалов, такого как H₂O₂.

Изобретение относится, в частности, к композиции в соответствии с изобретением в качестве фармацевтической композиции, причем указанная композиция содержит по меньшей мере одну соль металла, причем металл выбран из молибдена (Mo), вольфрама (W), ванадия (V), золота (Au), лантаноида, в частности лантана; по меньшей мере один хелатирующий агент и источник пероксидантных радикалов. Такая композиция согласно изобретению полезна в способе терапевтического лечения.

Изобретение также относится к способу терапевтического лечения, включающему применение, преимущественно посредством местного применения у субъекта, нуждающегося в лечении, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции в соответствии с изобретением.

Изобретение также относится к способу получения фармацевтической композиции в соответствии с изобретением для использования в способе терапевтического лечения.

Изобретение, в частности, относится к фармацевтическим композициям, содержащим или состоящим из смеси в соответствии с изобретением.

Таким образом, изобретение относится к фармацевтической композиции для местного применения, отличающейся тем, что она содержит терапевтически активную смесь, как определено в соответствии с изобретением, или может быть получена в соответствии со способом, определенным в соответствии с изобретением.

Предпочтительно фармацевтическая композиция согласно изобретению содержит от 0,001 до 5 мМ, предпочтительно от 0,01 до 2 мМ и более предпочтительно от 0,02 до 1 мМ фармацевтически активной смеси.

Изобретение, в частности, относится к фармацевтической композиции для местного применения в соответствии с изобретением для ее использования в способе терапевтического лечения вирусной инфекции, и в частности, с участием вируса семейства Herpesviridae.

Изобретение, в частности, относится к фармацевтической композиции для местного применения в соответствии с изобретением для ее использования в способе терапевтического лечения инфекции, вызванной HSV-1 и/или HSV-2.

Изобретение, в частности, относится к фармацевтической композиции для местного применения в соответствии с изобретением для ее использования в способе противовоспалительного терапевтического лечения.

Изобретение, в частности, относится к фармацевтической композиции для местного применения в соответствии с изобретением для ее использования в способе профилактического или радикального терапевтического лечения.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей молибден, по меньшей мере один хелатирующий агент и источник пероксилирующих радикалов, для ее использования в способе терапевтического лечения герпеса. Эта композиция определяется в соответствии с любым из вариантов осуществления, альтернатив, преимуществ, предпочтений или примеров изобретения, взятых отдельно или в соответствии с любой их комбинацией.

Термин "согласно изобретению" ссылается на любой из вариантов осуществления, альтернативы, преимущества, предпочтения или примеры изобретения, взятые отдельно или в соответствии с любой их комбинацией.

Как правило, фармацевтические композиции для местного применения в соответствии с изобретением содержат вспомогательные вещества, и в частности, вспомогательные вещества, утвержденные фармакопеей.

Под противомикробным терапевтическим лечением подразумевается как превентивное терапевтическое лечение, так и профилактическое лечение и терапия, направленная на излечение, дающие возможность, например, ограничить инфекцию в случае контакта с инфекцией, частоту возникновения за-

болевания, его острую фазу, с частичной эрадикацией или без эрадикации возбудителя заболевания и/или ограничением его распространения.

Предпочтительно активная смесь или фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением активна *in situ* во время ее применения.

Предпочтительно активная смесь или фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением активна во время трансэпителиального проникновения и предпочтительно не допускает или допускает лишь ограниченное чрескожное проникновение.

Предпочтительно активная смесь или фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением дезактивируется во время чрескожного проникновения.

В соответствии с альтернативой смесь согласно изобретению или композицию, содержащую ее, наносят местным способом на область лица и рта.

В соответствии с альтернативой смесь согласно изобретению или композицию, содержащую ее, наносят местным способом на генитальную или анальную область.

В соответствии с альтернативой смесь согласно изобретению или композицию, содержащую ее, наносят местным способом на кожу.

В соответствии с альтернативой смесь согласно изобретению или композицию, содержащую ее, наносят местным способом на слизистую оболочку.

Согласно альтернативе вспомогательные вещества, одобренные Европейской Фармакопеей (Ph. Eur.), Национальными Фармакопеями (особенно USP, JP, IP, Ph. Helv., Ph. Belg., Ph. Fr., BP, DAB, OAB), а также Международными Фармакопеями (Ph. Int., ВОЗ) могут быть введены во время осуществления изобретения и/или в "смесь", обозначенную как "смесь 1".

Смеси и композиции по изобретению особенно подходят для фармацевтической активности у людей.

Предпочтительно активная смесь по изобретению дает возможность применения реакций типа Фентона-Габера-Вейса и подобных этому типу и предпочтительно генерации радикала HO_2^\bullet и в меньшей степени радикалов O_2^\bullet , HO^\bullet .

Согласно авторам настоящего изобретения проникновение реакционноспособного вещества HOO^\bullet является достаточным для ограниченной и контролируемой индукции апоптоза клеток.

Согласно авторам настоящего изобретения проникновение реакционноспособного вещества HOO^\bullet является достаточным для эффективного и контролируемого подавления вирусной репликации.

В соответствии с изобретением окислительно-восстановительный потенциал смеси по изобретению предпочтительно используют для ограничения в узком диапазоне концентраций предшественников радикальных активных веществ, чтобы обеспечить хорошее равновесие между эффектом подавления репликации/умеренной цитотоксичностью для здоровой клетки/значительной цитотоксичностью для инфицированной клетки профилактическим эффектом в отношении инфекции.

Предпочтительно терапевтически или фармацевтически активная смесь в соответствии с изобретением дает возможность главным образом и преимущественно генерировать реакционноспособные радикальные виды HOO^\bullet .

Таким образом, согласно настоящему изобретению внеклеточный кальций *in vivo* является основным фактором запуска продукции HOO^\bullet . Например, это в основном является действием на комплекс $2\text{Mo}(\text{vi})\text{-ВАРТА}_2(\text{H}_2\text{O}_2)$, когда соль молибдена и ВАРТА вводят в смесь по изобретению. Например, это в основном является действием на комплекс $2\text{Mo}(\text{vi})\text{-ЕГТА}_2(\text{H}_2\text{O}_2)$, когда соль молибдена и ЕГТА вводят в смесь по изобретению.

Предпочтительно продукция во внеклеточной среде HOO^\bullet обеспечивает внеклеточные модификации (например, окисление внемембранных аминокислотных остатков), которые могут таким образом ограничивать вирусную инфекцию путем изменения распознавания клеток.

Предпочтительно продукция во внеклеточной среде HOO^\bullet , а также его проникновение в клетки совместимы с его длительным временем жизни (≥ 1 с) и его большим проникновением в клетки по сравнению с OH^\bullet или O_2^\bullet (1 мс и проникновение порядка 1 нм). Преимущественно это вещество HOO^\bullet участвует в реакции Габера-Вейса и реакции Фентона ("подобной" или нет) на внеклеточном и внутриклеточном уровне и обеспечивает автономность последних.

Предпочтительно смесь, содержащая $\text{Mo}(\text{IV})$ в соответствии с настоящим изобретением, имеет рН от 4,4 до 5,0. Это, в частности, позволяет оптимизировать константы скорости k_{obs} ($\text{M}^{-1}\cdot\text{c}^{-1}$) разложения $\text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2^\bullet$.

Предпочтительно модификация внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала при контакте с композицией согласно изобретению обеспечивает апоптотическое/антиапоптотическое равновесие. В частности, это апоптотическое/антиапоптотическое равновесие особенно зависит от наличия инфекции HSV, и главным образом HSV-1 и -2.

В соответствии с альтернативой смесь по изобретению избирательно активна на клетках, инфицированных HSV и главным образом HSV-1 и -2.

Таким образом, существует тесное равновесие между путями стресса, вызванного HSV инфекцией,

включая приток кальция и регуляцию апоптоза.

Это равновесие нарушается из-за наличия радикалов внутри цитоплазмы и модификаций клеточного окислительно-восстановительного потенциала. Это индуцирует те же пути клеточного стресса, что и инфекция HSV, те же притоки кальция и те же самые индукции метаболических путей, и те же самые пути подвергаются обратной регуляции в направлении другого антиапоптотического равновесия. Это поддерживает терапевтический эффект смеси в соответствии с изобретением или композиций, содержащих ее.

В соответствии с альтернативой фармацевтическую композицию или смесь по изобретению используют в способе терапевтического лечения для лабиального и орофациального герпеса.

В соответствии с альтернативой фармацевтическую композицию или смесь в соответствии с изобретением используют в способе терапевтического лечения генитального и анального герпеса.

Согласно варианту осуществления активная смесь в соответствии с изобретением обладает противоинойфекционной эффективностью (оказывает умеренное или низкое прямое действие на вирус, вирусные рецепторы в клетке как возможные кандидаты), препятствует распознаванию и интернализации (значительное действие, клеточные рецепторы к вирусу). Эти эффективности являются внешними по отношению к клетке и ограничивают вирусную инфекционную активность. Таким образом, активная смесь в соответствии с изобретением имеет профилактическое действие. Таким образом, активная смесь в соответствии с изобретением обладает противоинойфекционной эффективностью.

В соответствии с альтернативой фармацевтическую композицию или смесь в соответствии с изобретением используют в терапевтическом лечении популяции клеток, экспрессирующих HSV в его оболочечной, репликативной или инфекционной форме.

В соответствии с альтернативой фармацевтическую композицию согласно изобретению или смесь используют при терапевтическом лечении популяции клеток или ткани, экспрессирующей HSV-1 (Kessler H.H. et al. (2000) "Detection of Herpes Simplex Virus DNA by real-time PCR", J Clin Microbiol, 38(7), 2638-2642).

В соответствии с альтернативой фармацевтическую композицию согласно изобретению или смесь используют при терапевтическом лечении популяции клеток или ткани, экспрессирующей HSV-2 (Kessler H.H. et al. (2000) "Detection of Herpes Simplex Virus DNA by real-time PCR", J Clin Microbiol., 38(7), 2638-2642).

Предпочтительно активная смесь в соответствии с изобретением обладает антирепликационной эффективностью, вызванной фактом предварительного контакта с инфекцией здоровой клетки или ткани. Активная смесь в соответствии с изобретением может быть использована для предотвращения инфекции путем ограничения внутриклеточной вирусной репликации и/или путем ограничения проникновения вируса в клетку.

Предпочтительно активная смесь в соответствии с изобретением обладает преимущественной эффективностью против репликации при клеточном метаболизме инфицированной клетки (пути окислительного стресса и каналы кальция). Активная смесь в соответствии с изобретением может быть специально использована для прямого действия против внутриклеточной вирусной репликации и против суперинфекции клеток HSV-1 и/или HSV-2 той же инфицированной ткани или здоровой ткани, близкой к ней.

Согласно альтернативе активная смесь в соответствии с изобретением гетерогенно индуцирует ингибирование продукции интерлейкина-6 (IL-6) кожного лоскута человека, и следовательно, обладает противовоспалительной эффективностью.

Описание фигур

На фиг. 1 представлены изменения окислительно-восстановительного потенциала и концентрации H_2O_2 при приготовлении смеси 1.

На фиг. 2 показан график Fe^{3+} , используемый для анализа окислительно-восстановительной эффективности смеси 1.

На фиг. 3 показана окислительно-восстановительная эффективность смеси 1 при различных ее концентрациях (поглощение кверцетина по $Fe(III)$ в плазме человека после контакта (2 мин) со смесью 1 (в $nM MoO_4^{2-}$).

Фиг. 4 иллюстрирует номограмму окислительно-восстановительной эффективности смеси 1 при различных концентрациях последней.

Фиг. 5 иллюстрирует влияние смеси 1 при разной концентрации MoO_4^{2-} на продукцию *in situ* в плазме человека Fe^{3+} , (i) на выделение из комплекса трансферрин- Fe^{3+} после контакта с препаратом, (ii) на равновесие Fe^{2+}/Fe^{3+} и (iii) на окисление кверцетина.

Фиг. 6 иллюстрирует продукцию интерлейкина-6 (IL-6) в надосадочной жидкости культур биоптатов здоровой кожи человека (2 мин), стимулированных смесью 1 (24,3 μM активного вещества) или NaCl (100 mM) в качестве контроля, (D1-5: донор 1-5, B1 или 2: биоптат 1 или 2).

Фиг. 7 иллюстрирует среднее значение продукции в течение 6 и 24 ч после контакта с интерлейкином-6 (IL-6) в надосадочной жидкости культуры здорового стимулированного биоптата кожи человека (2 мин) с помощью смеси 1 (24,3 μM активного вещества) или NaCl (100 mM) в качестве контроля.

На фиг. 8 представлена окислительно-восстановительная эффективность смеси 1 и смеси 2 при различных концентрациях (поглощение кверцетина Fe(III) в плазме человека после контакта (2 мин) со смесью 1 (в нМ MoO_4^{2-}) или со смесью 2 (в нМ $\text{La}(\text{MoO}_4)^{1-}$).

Примеры

Пример 1. Пример активной смеси в соответствии с изобретением.

Данный пример получен с солью молибдена. Готовили композицию формулы в соответствии с табл. 1 ("смесь 1"), выраженную в виде исходной концентрации компонентов.

Таблица 1

Компоненты	Смесь в соответствии с изобретением
Натрия молибдат	20,7 мкМ
ВАРТА	12,6 мкМ
ЕГТА	526 мкМ
H_2O_2	353 мМ
$\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$	70 мМ
pH (с NaOH)	4,4 – 5,0
E° окислительно-восстановительный	300 - 420 мВ

Композиция считается "исходной" композицией, так как она соответствует концентрациям добавленных реагентов без учета применяемого каталитического процесса.

Все компоненты, используемые для синтеза, а также готовый продукт, подтверждаются их спектром ИК-Фурье.

Таблица 1a

Продукт	Чистота	Формула соединения	CAS No.
Натрия молибдат дигидрат	98-103%	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10102-40-6
ВАРТА : (1,2-бис(о-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота)	$\geq 98\%$	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	85233-19-8
ЕГТА: (этиленгликоль-бис(2-аминоэтилэфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота)	$\geq 99\%$	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	67-42-5
Перекись водорода	29-31%	H_2O_2	722-84-1
Ледяная уксусная кислота	99,8-100,5%	CH_3COOH	64-19-7
Натрия ацетат тригидрат	99-101%	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5010524
Натрия гидроксид	10 н	NaOH	1310-73-2
Деминерализованная вода	1 мкС	H_2O	7732-18-5

Цифры измерений, проведенных во время и после синтеза, являются средними значениями от трех партий.

Указанные ниже количества предназначены для приготовления одного литра смеси 1.

А - этап (i): приготовление буферного раствора (раствор BS).

CH_3COOH (100%; 5: 1,05 г/см³ (жидкость, 20°C)) - 4,0 мл (итоговая 70 мМ).

$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (100%) - 8 г (итоговая 59 мМ).

Вода - до 1 л.

Проверка pH 4,7-4,8.

Комнатная температура (20°C).

В - этап (ii): приготовление раствора комплекса металла (раствора CS).

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (источник Mo(VI); 100%) - 200 мг (в итоге 2,4 мМ).

Вода - до 340 мл.

Умеренное перемешивание при комнатной температуре.

С - этап (iii): приготовление исходного раствора (Si1).

Вода - 900 мл.

CH_3COOH (100%) - 4 мл (70 мМ).

Добавляли очень медленно, а затем очень слабо перемешивали (250 об/мин),

pH 2,9-3,8.

E° окислительно-восстановительный 470-490 мВ,

а затем

H_2O_2 (30%) до конечной концентрации 1,2 мас.% и в соответствии с предварительными анализами.

На 45 мин:

pH 2,70-2,90.

E° окислительно-восстановительный 440-460 мВ.

По уравнению Нобля $[\text{H}_2\text{O}_2]=380-410$ мМ (раствор Si1).

D - этап (iv): приготовление исходного раствора (Si2).

Вводили "раствор BS" в раствор Si1 - 12 мл (≈ 1 мМ ацетат).

Добавляли при умеренном перемешивании.

На 45 мин:

pH $\approx 2,90$.

E° окислительно-восстановительный 460-480 мВ.

По уравнению Нобля $[H_2O_2]=360-410$ мМ - (раствор Si2).

E - этап (v): приготовление раствора пероксомолибдена S1.

Вводили "раствор CS" в раствор Si2 - 10 мл.

На 45 мин:

pH 2,80-3,00.

$E_{\text{окислительно-восстановительный}}$ 450-480 мВ.

По уравнению Нобля $[H_2O_2]=370-400$ мМ - (раствор S1).

F - этап (vi): приготовление раствора S2.

Доведение pH при умеренном перемешивании:

NaOH 9,9-10,1 М 3,6 мл для 0,9 л смеси 1.

pH 4,5-5,0.

На 45 мин:

pH 4,60.

$E_{\text{окислительно-восстановительный}}$ 380-390 мВ - (раствор S2).

G - этап (vii): добавление хелатирующих агентов - приготовление раствора S4.

Введение ВАРТА (98,8%) - 6 мг/л,

после очень медленного растворения ВАРТА при умеренном перемешивании в аликвоте композиции S2 (1,4 л), предварительно уравновешенной при 25°C (так называемый раствор "S3,1").

Объединяли раствор S3,1 с раствором S2 для получения раствора S3,2.

На 45 мин:

pH 4,40-4,70.

$E_{\text{окислительно-восстановительный}}$ 380-390 мВ.

По уравнению Нобля $[H_2O_2]=370-390$ мМ.

Введение EGTA (99,1%) - 200 мг/л в раствор S3,2 для получения раствора S4.

Растворяли при умеренном перемешивании.

На 45 мин:

pH 4,40-4,60.

$E_{\text{окислительно-восстановительный}}$ 380-390 мВ.

По уравнению Нобля $[H_2O_2]=370-420$ мМ.

H - этап (viii): доведение pH.

Доведение pH (NaOH 9,9-10,1 М, т.е. ≈ 400 г/л) \Rightarrow pH: $4,60 \pm 0,2$.

I - этап (ix): доведение объема итогового раствора (FS).

Доведение объема деминерализованной водой - до 1 л.

На 12-18 ч:

pH 4,50-4,70.

$E_{\text{окислительно-восстановительный}}$: 380-390 мВ.

По уравнению Нобля $[H_2O_2]=350-380$ мМ.

По титрованию $[H_2O_2]=400-430$ мМ.

Плотность: $\delta=1,004$ г/мл.

Смесь в соответствии с изобретением, готовая к применению, стабильна в темноте в течение более 6 месяцев при комнатной температуре или при 45°C.

Концентрация Na гидропероксомолибдата составляет 24,3 мкМ в итоговой смеси 1.

Пример 2. Характеристики при вариации окислительно-восстановительного потенциала.

Характеристики активной смеси в соответствии с настоящим изобретением оценивали при вариации окислительно-восстановительного потенциала во время синтеза композиции, приготовленной в соответствии с примером 1.

В соответствии с фиг. 1 относительно исходного раствора (≈ 470 мВ, этап 3) восстановление окислительно-восстановительного потенциала составило ≈ 90 мВ (≈ 380 мВ) на этапе 6 (доведение pH гидроксидом натрия). Окислительно-восстановительный потенциал оставался постоянным до конца синтеза (этап 9). То же самое относится к выдерживанию составов смеси по изобретению в соответствии с примером 1 в течение 6 месяцев при комнатной температуре (389 ± 5 мВ) и при 45°C (389 ± 8 мВ) при pH $4,56 \pm 0,40$ и $4,53 \pm 0,41$ соответственно.

Пример 3. Характеристики потребления и продукции H_2O_2 - генерация равновесия пероксо-реактанта и окислительно-восстановительный потенциал смеси 1.

Характеристики активной смеси в соответствии с настоящим изобретением оценивали по потреблению и продукции H_2O_2 во время синтеза композиции, полученной в соответствии с примером 1.

В соответствии с фиг. 1 относительно концентрации исходного раствора H_2O_2 (353 мМ, этапы 3-10) наблюдалась внезапная продукция перекиси (≈ 42 мМ, включая небольшую фракцию перуксусной кислоты) из-за добавления H_2O_2 в буферный раствор (уксусная кислота/ ацетат). Если добавление H_2O_2 не проводят в забуференном кислотой водном растворе (этап 3, pH $2,84 \pm 0,1$), его спонтанное и быстрое разложение происходит из-за слишком высокого pH (воды) ($pK_{a_{H_2O_2} \rightarrow O_2 \cdot^-}$: 4,8).

С этапа 4 до этапа 7 наблюдалось ограниченное потребление H_2O_2 (10 ± 6 мМ) до его стабилизации при 381 ± 5 мМ (этап 7+ВАРТА).

Добавление EGTA смещало перекисное равновесие (фентонподобной реакции) путем деградации перекиси, то есть от 393 ± 29 мМ на этапе 7, до 357 ± 26 мМ на этапе 9 и 365 ± 15 мМ на этапе 9 + 12 ч.

На этапе 6 наблюдалось внезапное падение окислительно-восстановительного потенциала (от 463 ± 15 до 392 ± 17 мВ) при доведении pH. Добавление (этап 7) хелатирующих агентов ВАРТА, а затем EGTA последовательно способствовало стабилизации окислительно-восстановительного потенциала (386 ± 5 и 383 ± 6 мВ) путем стабилизации химических равновесий.

Пример 4. Определение окислительно-восстановительной эффективности смеси по изобретению; кверцетиновые методы.

А. Реактивные растворы.

1. Кверцетин.

Готовили раствор кверцетина дигидрата (2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидрокси-4Н-1-бензопиран-4-он дигидрат, 3,3',4',5,7-пентагидроксифлавоон дигидрат; $(\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ с концентрацией 10^{-3} моль/л в метаноле.

2. Раствор соляной кислоты.

Первый раствор соляной кислоты 1 М готовили в метаноле. Второй раствор готовили с концентрацией 0,3 М в метаноле. Реактивный раствор готовили путем добавления 343 мкл 1 М раствора к 1,357 мкл 0,3 М раствора.

3. Растворы Fe^{3+} (справочный график).

Раствор Fe^{3+} ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) с концентрацией 2 мг/мл готовили в воде ВЭЖХ качества. Затем его разбавляли для получения восьми растворов сравнения 20, 100, 200, 300, 400, 500, 1,000 и 1,500 мкг/мл. Эти растворы в итоге разбавляли в 20 раз плазмой человека или водой ВЭЖХ качества для итогового получения концентраций 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 и 75 мкг/мл.

4. Растворы Fe^{2+} (справочная номограмма, контроль активности).

Раствор Fe^{2+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) с концентрацией 89 мг/мл готовили в воде ВЭЖХ качества. Затем его разбавляли для получения трех растворов сравнения: 0,445, 4,45 и 44,5 мг/мл. Эти растворы в итоге разбавляли в 10 раз водой ВЭЖХ качества для итогового получения концентраций: 0, 0,0445, 0,445 и 4,45 мг/мл.

В. Количественные анализы кверцетиновым методом.

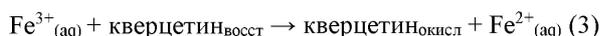
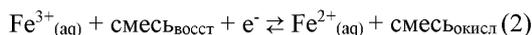
Присутствие Fe^{3+} (номограмма) или его продукцию (Fe^{2+} номограмма и эффективность смеси по изобретению спустя 2 мин контакта) рассчитывали кверцетиновым методом.

В соответствии с условиями анализа или применением смеси 1:

"смесь_{окисл}" означает смесь в соответствии с изобретением в качестве окислителя.

"смесь_{восст}" означает смесь в соответствии с изобретением в качестве восстановителя.

Продукция Fe^{3+} является следующей:



Реакция (1) происходит в среде плазмы.

Реакция (2) происходит в среде плазмы или воде ВЭЖХ и соответствует равновесию реакции Фентона-Габера-Вейса.

Реакция (3) является окислительной реакцией кверцетина для оценки окислительно-восстановительного потенциала смеси 1.

В кислой среде и при 70°C кверцетин специфически окисляется ионом трехвалентного железа (Fe^{3+} ; El Hajji et al., 2006 и Walcerzak et al., 2008) из трансферрина в среде плазмы, а не ионом двухвалентного железа (Fe^{2+}). Ион Fe^{3+} является растворимым в этих условиях.

30 мкл раствора кверцетина добавляли к 170 мкл реактивного раствора соляной кислоты. После гомогенизации добавляли 50 мкл образца (Fe^{3+} в плазме человека или в воде ВЭЖХ качества, Fe^{2+} в воде ВЭЖХ качества, смесь по изобретению через 2 мин контакта с плазмой человека). Растворы интенсивно перемешивали в течение непродолжительного времени, а затем инкубировали в течение 1 ч при 70°C . После инкубации образцы центрифугировали в течение 15 мин при 14000 об/мин и при комнатной температуре. Отбирали 100 мкл надосадочной жидкости. УФ-спектр каждого образца получали от 230 до 500 нм. Вычитали показания холостой пробы: воды, Fe^{2+} , Fe^{3+} , плазмы в зависимости от типа эксперимента. Сохраняется пик поглощения кверцетина, окисленного Fe^{3+} из трансферрина плазмы и в реакции Фентона-Габера-Вейса in situ (от 285 до 305 нм).

Вершина кривой центрирована в направлении 292 нм, когда эксперимент проводили в воде ВЭЖХ или в плазме. Он может перемещаться на максимум 10 нм при вычитании экспериментальных холостых проб.

1. Номограмма для расчета Fe^{3+} .

Номограмму для иона Fe(III) получают, например, путем измерения УФ-поглощения (в диапазоне 250-330 нм) окисленного кверцетина для различных концентраций Fe³⁺ (см. диапазон Fe³⁺ выше) в плазме человека и путем построения оптической плотности в зависимости от длины волны.

Из спектра области 250-330 нм рассчитывают площадь под кривой (AUC) между 285 и 305 нм по формуле

$$AUC_{285\text{ нм}}^{305\text{ нм}} = \int_{285\text{ нм}}^{305\text{ нм}} f(x)dx = \int_{285\text{ нм}}^{305\text{ нм}} \text{Поглощение} \cdot d(\lambda)$$

Соответственно каждую площадь поверхности пика 285-305 нм для каждой точки диапазона Fe³⁺ наносили на график. Строили кривую тенденции (Excel), вычитали уравнение (коэффициент корреляции R², для которого самое близкое значение к 1 проверяет эксперимент) (Excel).

Оно может быть линейной или полиномиальной формой типа $y=ax^2+bx+c$. При эксперименте это соотношения может быть типа

$$y = -0,0021x^2 + 0,4819x + 0,4521; R^2 = 0,9966 \text{ (фиг. 2). (4)}$$

Для смеси согласно изобретению концентрация эквивалента Fe³⁺, полученного в плазменной среде или из Fe²⁺, является отражением окислительного потенциала из изобретения и рассчитывается из уравнения (4). Это не прямой метод измерения окислительно-восстановительной эффективности смеси 1 путем анализа УФ-поглощения кверцетина, окисленного Fe³⁺. Соответственно упоминается концентрация в Fe³⁺ "эквиваленте". Кроме того, можно сравнить окислительно-восстановительный потенциал раствора в соответствии с изобретением, подлежащего испытанию, с показателями эталонного раствора в соответствии с изобретением, другими словами, путем сравнения с количественной оценкой окислительно-восстановительной эффективности смеси в соответствии с изобретением.

2. Номограмма Fe²⁺.

Таким же способом, как для иона Fe(III), получали график для иона Fe(II). Например, пик УФ-поглощения (230-500 нм) кверцетина, окисленного Fe³⁺, полученным из смеси по изобретению при 1,22 мкМ активного вещества (250 мкг/л) и через 2 мин контакта с Fe²⁺, измеряли в диапазоне, описанном выше. Можно провести такие же математические анализы AUC, как описано для Fe(III) иона.

3. Количественное определение окислительно-восстановительной эффективности смеси по изобретению, например, для 1,22 мкМ (250 мкг/л) активного вещества MoO₄²⁻.

В соответствии с процедурой, описанной в пункте В, окислительно-восстановительную эффективность смеси по изобретению (1,22 мкМ MoO₄²⁻ в плазме человека) тестировали для (i) оценки ее старения при комнатной температуре и при 45°C; (ii) валидации ее производства и сравнительной оценки составов; (iii) количественного определения ее трансдермального проникновения; (iv) оценки ее биодоступности и (v) оценки ее биофазы.

Согласно уравнению (4) удельную площадь пика поглощения УФ рассчитывали (как AUC) между 285 и 305 нм пика кверцетина, окисленного свободным Fe³⁺, полученным после контакта плазмы в течение 2 мин со смесью по изобретению (уравнения (1), (2) и (3)) при итоговой концентрации 1,22 мкМ с комплексом трансферрин- Fe³⁺. В среднем продукция эквивалента Fe³⁺ (Fe³⁺_{эkv}) составила порядка 30-50 мкг/мл плазмы.

4. Определение с помощью номограммы эффективной концентрации смеси по изобретению в среде плазмы.

Железо плазмы не является свободным. Оно связано с трансферрином (или сидерофилином) в его трехвалентной форме (Fe³⁺) в количестве от 1 до 2 остатков на молекулу. Железо в его двухвалентной форме (Fe²⁺) не циркулирует вне его комплекса с гемоглобином. Считается, что используемая плазма человека не гемолизирована. Кверцетиновая реакция смеси по изобретению с медью плазмы считается незначительной.

Ряд концентраций смеси по изобретению (15,2; 7,6; 3,8 и 1,9 нМ итогового MoO₄²⁻) инкубировали в плазме человека. Реакцию с кверцетином проводили, как описано в пункте В. Пик удельного поглощения (за вычетом холостой пробы плазмы+кверцетин) был интегрирован, как описано в В-1 (фиг. 3).

Строили график (Excel) в полиномиальной форме, и рассчитывали уравнение тенденции ($y=0,0144x^2+0,5863x+0,4511$ с $R^2=0,9934$ (5); фиг. 4).

Соотношение пропорциональности (уравнение 5) установлено между количеством по изобретению в добавленной концентрации к плазме человека и количеством эквивалента Fe³⁺ (уравнение 4), обнаруженным по реакции окисления кверцетина, то есть 28,95; 12,19; 3,97; 3,12 мкг Fe³⁺_{эkv}/мл плазмы человека, в соответствии с диапазоном смеси по изобретению, описанной выше.

Пример 5. Оценка окислительно-восстановительной эффективности по изобретению на плазме человека.

После добавления смеси в соответствии с изобретением (пример 1 - смесь 1) в плазму человека и после времени контакта 2 мин до концентрации 0,03038 мкМ MoO₄²⁻, реакция окисления кверцетина для продукции Fe³⁺ из комплекса трансферрин Fe³⁺ плазмы и реакция Фентона-Габера-Вейса является оптимальной и линейной (см. пример 4).

После вычитания значений экспериментальных холостых проб увеличение концентрации по изобретению приводило к уменьшению продукции *in situ* кверцетина, окисленного Fe^{3+} , из-за смещения равновесий реакции Фентона-Габера-Вейса ($Fe^{3+} \rightleftharpoons Fe^{2+}$). Итоговые испытанные концентрации MoO_4^{2-} составили 0,00; 1,22; 4,05; 12,15; 24,30 и 30,38 мкМ (фиг. 5).

Пример 6. Антирепликационная эффективность.

А. Модели.

Испытывали четыре контактных модели смеси в соответствии с примером 1 ("Смесь 1"). Они представляют четыре физиологических возможности, с которыми смесь 1 может столкнуться при местном терапевтическом применении, т.е.

модель 1: смесь 1 на клетках, инфицированных HSV-1;

модель 2: смесь 1 на клетках, не инфицированных HSV-1;

модель 3: смесь 1 на клетках, еще не инфицированных, и смесь 1 на свободных от HSV-1 (еще не инфицированных) клетках;

модель 4: смесь 1 на HSV-1 перед инфекцией.

Анализировали два времени контакта смеси 1, т.е. 2 мин или 1,5 мин, с последующим удалением смеси 1.

Анализировали две концентрации смеси 1: 0,81 и 2,03 мкМ активного вещества, т.е. 167 и 417 мкг/л соответственно.

В качестве метода количественного определения эффективности использовали кПЦР (количественную полимеразную цепную реакцию: Mullis K. et al. (1986) "Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction", Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol, 51 (Pt 1), 263-273.)

Антирепликационную эффективность (АЭ) смеси 1 для HSV-1 оценивали с помощью кПЦР со специфическими праймерами вирусного генома (Kessler H.H. et al. (2000) "Detection of Herpes simplex vims DNA by real-time PCR" J. Clin. Microbiol, 38(7), 2638-2642).

Цитотоксичность смеси 1 (Ц) на линии ВНК-21 оценивали посредством кПЦР со специфическими праймерами гена малой рибосомной субъединицы 18S (Texcell - Evgu, Франция).

Множественность заражения (МО): 1, т.е. $5 \cdot 10^5$ TCID₅₀ (дозы заражения 50% культуры тканей).

Эксперименты с количественной ПЦР проводили на 0 ч (2 ч после контакта ВНК-21 и HSV-1 с последующим удалением HSV-1), 2, 4 и 8 ч после инфекции.

Отношение АЭ/Ц дает индекс эффективности *in vitro* (ИЭ) смеси 1, соответствующий модели исследования.

Модель 1.

ВНК-21+HSV-1 (2ч; инфекция)→промывание (PBS) для удаления вируса→образцы t0 ч→+смесь 1 (2 мин)→промывание (культуральная среда) для удаления смеси 1→инкубация клеток при 37°C→образцы t2, t4 и t8 ч после инфекции.

Модель 2.

ВНК-21+смесь 1 (1,5 и 2 мин)→промывание (PBS) для удаления смеси 1→клетки+HSV-1 (2 ч; инфекция)→промывание (культуральная среда) для удаления HSV-1→образцы t0 ч→инкубация клеток при 37°C→образцы t2, t4 и t8 ч после инфекции.

Модель 3.

ВНК-21+смесь 1 (1,5 и 2 мин)→промывание (PBS) для удаления смеси 1.

HSV-1+смесь 1 (1,5 и 2 мин)→промывание (PBS) для удаления смеси 1.

Пул клеток и вирусов, имевших предварительный контакт со смесью 1 (2ч; инфекция)→промывание (культуральная среда) для удаления HSV-1→образцы t0 ч→инкубация клеток при 37°C→образцы t2, t4 и t8 ч после инфекции.

Модель 4.

HSV-1+смесь 1 (2 мин)→промывание (PBS) для удаления смеси 1→+ВНК-21 (2ч ; инфекция)→промывание (культуральная среда) для удаления HSV-1→образцы t0 ч→инкубация клеток при 37°C→образцы t2, t4- и t8 ч после инфекции.

В. Результаты.

Таблица 2

Уменьшение до 8 ч размножения HSV-1 в ВНК-21 клетках после контакта со смесью 1 (в мкг/л активного вещества) или ацикловиrom (АЦВ); Индекс эффективности in vitro (ИЭ)

Вещество	Уменьшение репликации HSV-1 на т8ч (%)*					ИЭ на т8ч / модель**				
	Смесь 1		АЦВ	Смесь 1		Смесь 1		АЦВ	Смесь 1	
Время контакта (мин)	2	2	2	1,5	1,5	2	2	2	1,5	1,5
Концентрация (мкг/л)	167	417	10 ³	167	417	167	417	10 ³	167	417
Модель 1	-97	-98	-12	НТ	НТ	37	48	2	НТ	НТ
Модель 2	-72	-96	-1	-70	-86	4	23	1	3	7
Модель 3	-93	-97	-6	-78	-90	14	35	1	4	10
Модель 4	-56	-69	-52 [#]	НТ	НТ	2	3	2 [#]	НТ	НТ

* - уменьшение репликации HSV (УР) анализируемыми веществами (смесь 1, контроль ацикловиrom) выражено в процентах и соответствует подсчетам с помощью количественной ПЦР отношения геномов HSV-1 и цитотоксичности, которую оценивали по количественному определению субъединицы 18S клеткой-хозяином: $УР = \{ (100 \times ([HSV-1]_{опыт} / [18S]_{опыт})) / ([HSV-1]_{контроль+} / [18S]_{контроль+}) \} - 100$;

** - индекс эффективности для подавления репликации in vitro (ИЭ) анализируемых веществ представлен $([HSV-1] / [18S])$ при оценке в специфической кПЦР положительного контроля, инфицированного HSV ($[HSV-1]_{контроль+} / [18S]_{контроль+}$) против значений для анализируемых веществ (смесь 1, контроль ацикловиrom): $ИЭ = ([HSV-1]_{контроль+} / [18S]_{контроль+}) / ([HSV-1]_{опыт} / [18S]_{опыт})$;

- [АЦВ]: 1 г/л.

Наилучшие значения ИЭ (табл. 2) получены спустя 2 мин контакта смеси 1 и при концентрации 417 мкг/л. Мы отметили значительное влияние времени контакта на ИЭ (1,5 и 2 мин, модели 2 и 3).

ИЭ, полученные на моделях 1 и 3 со временем контакта 2 мин и концентрацией смеси 1 167 мкг/л, являются особенно значительными.

Независимо от модели ИЭ, полученные с ацикловиrom ("ACV"), не были значительными (табл. 2).

Таблица 3

Процентное значение при количественном определении посредством количественной ПЦР (гены 18S или HSV; спустя 8 ч после контакта в течение 2 мин): (i) размножения линии ВНК-21 (контроль: не инфицированная линия) и (ii) репликации HSV-1 (контроль: инфицированная линия)

Ген/геном	18S (%)					HSV (%)			
	Линия+ (PBS - HSV)		Линия + (PBS + HSV)			Смесь 1		АЦВ (мг/л)	
Анализируемое вещество	Смесь 1		Смесь 1		Смесь 1		АЦВ (мг/л)		
	[активное вещество]	167 μg/L	417 μg/L	167 μg/L	417 μg/L	167 μg/L	417 μg/L	167 μg/L	417 μg/L
Модель 1	45	27	108 (1)	49	30	118 (1)	1	< 1	
Модель 2	62	41	57 (1)	68	44	62 (1)	19	2	
Модель 3	118	70	111 (1)	98	58	92 (1)	7	2	
Модель 4	120	107	97 (10 ³)	139	123	111 (10 ³)	64	38	
Анализы	1	2	3	4	5	6	7	8	
								9	

Для смеси 1 (при концентрации 167-417 мкг/л) или АЦВ (в концентрации 10³ мг/л) независимо от используемого контроля (линия+PBS-HSV или линия+PBS+HSV) результаты количественного определения 18S являются сопоставимыми для одной и той же модели (табл. 3, опыт 1 против 4, 2 против 5, 3 против 6).

Для смеси 1 достигалась дозозависимая значительная антирепликационная эффективность (табл. 3, опыты 7 и 8) для моделей 1, 2 и 3. Она не достигалась для АЦВ (табл. 3, опыт 9).

Сопоставимая цитотоксичность смеси 1 (167 мкг/л) и АЦВ (1 мг/л) (табл. 3) отмечена в соответствии с моделями 2 и 3 (табл. 3, опыты 1, 3, 4 и 6).

Отмечено отсутствие анти-HSV эффективности (табл. 2 и 3, опыт 9) для АЦВ (1 мг/л или 1 г/л). Модели, введенные для исследования смеси 1, не соответствуют исследованию, связанному с АЦВ.

Для модели 1 (смесь 1 на инфицированных клетках):

наилучший ИЭ (табл. 2) с двумя концентрациями смеси 1 (2 мин контакта, 167 и 417 мкг/л, ИЭ: 37 и 48 соответственно).

Смесь 1 оказывала прямой эффект (табл. 2 и 3) на внутриядерную репликацию вируса, вероятно, на клеточный метаболизм.

Смесь 1 обладала хорошей специфичностью в отношении инфицированных клеток (табл. 3, опыты 4 и 5; модель 1 против 2).

Для модели 2 (смесь 1 на клетках перед инфицированием):

интересующий ИЭ (табл. 2; контакт в течение 2 мин и 417 мкг/л; ИЭ: 23).

Смесь 1 оказывала влияние на клетки, которые становились менее восприимчивыми к инфекции и/или приобретали метаболизм, несовместимый с репликацией вируса (табл. 3, опыты 7 и 8).

Для модели 3 (смесь 1 на не инфицированных клетках и HSV-1, по отдельности и перед объединением в пул):

интересующий ИЭ (табл. 2) с двумя концентрациями смеси 1 (2 мин контакта, 167 и 417 мкг/л, ИЭ: 14 и 35 соответственно).

В зависимости от используемой дозы (167 или 417 мкг/л) нулевая цитотоксичность (табл. 3, опыт 4) или ограниченная цитотоксичность (табл. 3, опыт 5) при очень хорошей антивирусной эффективности (табл. 3, опыты 7 и 8 соответственно).

Мы отметили эффективность смеси 1, что является аккумуляцией модели 2 со значительным действием на клетки, и модели 4 с ограниченным действием на вирус по отдельности (табл. 2 и 3).

Для модели 4 (смесь 1 на HSV-1):

низкий ИЭ (время контакта: 2 мин, 167 и 417 мкг/л, ИЭ: 2 и 3 соответственно; табл. 2), что подтверждалось отсутствием цитотоксичности, но значительной репликацией вируса (табл. 3, опыты 8 и 9).

С. Выводы.

На линии ВНК-21 основная эффективность смеси 1 заключалась в (i) наличии предпочтительно цитотоксичности для инфицированных клеток; (ii) ингибировании вирусной репликации инфицированных клеток и (iii) ограничении инфицирования здоровых клеток.

Мишенью может быть мембрана (например, рецепторы для вируса) и/или метаболизм (например, регуляция стресса и путей апоптоза).

Распознавание и интернализация вируса.

В соответствии с моделью 4 смесь 1 обладает низкой прямой антирепликационной эффективностью в отношении вируса. В этих экспериментальных условиях, близких к терапевтическому применению, это наблюдение согласуется с ограниченным изменением вирусных рецепторов на клетке: gB (HSV-2), gC (HSV-1), gD и gH/gL (HSV-1 и -2). Смесь 1 меняет только ограниченным образом вирусные гликопротеины посредством реакции Фентона-Габера-Вейса *in vitro*.

Подобным образом, мы не отметили существенного влияния смеси 1 на фосфолипидную мембрану HSV, которое может нарушать слияние и пенетрацию мембраны.

В этих условиях эксперимента смесь 1 не является вируцидной.

Вирусная репликация и метаболизм клеток.

Методика количественной ПНР использует клеточный лизат спустя 8 ч после инфекции. Снижение репликации вируса может быть результатом плохого распознавания и/или интернализации и/или репликации (модификации метаболизма клеток, вызванной инфекцией и/или смесью 1).

Если бы вирусный путь распространения был изменен смесью 1 без изменения других путей и независимо от модели, то полученные ИЭ были бы намного меньше из-за накопления вирионов в цитоплазме.

В соответствии с моделью 2 (ИЭ: 23 со временем контакта 2 мин и 417 мкг/л) наблюдается низкая вирусная репликация после предварительного клеточного контакта со смесью 1 (табл. 2 и 3, опыт 8).

В соответствии с этой моделью клетки ВНК-21 находились в контакте в течение 2 мин со смесью 1. Время контакта с HSV в полной питательной культуральной среде составило 2 ч. Клеточные модификации, индуцированные смесью 1, имеют продолжительное время действия более 2 ч и дополнительно прогнозируют профилактическую эффективность смеси 1.

В дополнение к распознаванию HSV-1 клеткой, частично подвергнутой влиянию смеси 1, из-за ее вероятного и ограниченного действия на вирусный гликопротеин gD (38% репликации, табл. 2), на это распознавание также может влиять действие на рецепторы клеток к gD (HVEM и нектину), а также на два других рецептора поверхности клеток к gB и gH/gL, которые представляют собой гепарансульфаты и интегрины.

Из-за проникновения радикалов (модификации внутриклеточного или трансмембранного окислительно-восстановительного потенциала, регуляции путей окислительного стресса) потоки кальция клеток могут перемещаться. Эти притоки кальция клеток также индуцируются инфекцией HSV. Однако последнее может быть немедленно демобилизовано из-за введения в смесь 1 свободных и непроникающих хелатирующих агентов (ограничение клеточной цитотоксичности). Другие основные модификации клеток, с другой стороны, не должны исключаться и могут соответствовать окислениям или восстановлениям белков (например, цистеинильных мостиков), и в частности, структурных белков, которые могут возникать при вирусном эндоцитозе.

В соответствии с моделью 3 (табл. 2 и 3, опыты 7 и 8) наблюдается значительное снижение репликации вируса (ИЭ: 14 и 35 для времени контакта 2 мин, 167 и 417 мкг/л соответственно).

Оба феномена накапливаются. Первый - это ограниченное действие на вирус (см. модель 4), второй - более значимое действие на клетку (см. модель 2).

Добавление ИЭ моделей 2 и 4 (2 мин и 417 мкг/л), т.е. 23 и 3 соответственно, дает сумму (26) меньшую, но более близкую к экспериментально полученной для модели 3, т.е. 35.

Предполагается потенциальное накопление (i) плохого распознавания партнеров HSV и клеток и (ii) ингибирования интернализации и/или репликации, в частности, путем изменения клеточного метаболизма.

Модель 1 (ИЭ: 48 с 2 мин времени контакта и 417 мкг/л) является наиболее эффективной.

Действие противoinфекционной смеси 1 проявляется предпочтительнее в отношении клетки, чем

вируса. Это действие тем более заметно, поскольку клетка предварительно заражена.

На этой модели, которая лучше соответствует терапевтической проблеме, очевидно, что смесь 1 имеет специфическую значительную внутриклеточную фармакологическую эффективность. Для 417 мкг/л активного вещества табл.3 показывает, что количество рибосомальных субъединиц 18S меньше (в зависимости от используемого контроля, 27 и 30%, опыты 2 и 5) в этой модели, чем на модели 2 (в зависимости от используемого контроля, 41 и 44%, опыты 2 и 5) и на модели 3 (в зависимости от используемого контроля, 70 и 58%, опыты 2 и 5), что является аргументом в пользу специфичности для инфицированной клетки по сравнению со здоровой клеткой.

Мишени смеси 1 в этой модели не могут быть либо распознаванием, либо интернализацией, а фактически являются метаболическими модификациями. Последние помещаются в новое равновесие, особенно из-за трансмембранного перехода радикалов, модификации окислительно-восстановительного потенциала клетки и наличия внешних хелатирующих агентов, между маршрутами окислительного стресса (уже вызванными инфекцией), потоками кальция (уже вызванными инфекцией), ингибирования кальцийзависимого высвобождения вирионов, окислительных модификаций белков, прямо или косвенно вовлеченных в репликацию вируса.

Пример 7. Оценка продукции интерлейкинов *ex vivo*.

Биоптаты непатологических тканей (8 биоптатов от 4 доноров) кожи человека, полученные при хирургических операциях по поводу снижения массы тела, обрабатывали *ex vivo* смесью 1 (5 мг/л активного вещества, 2 мин). Надосадочные жидкости от биоптатов отбирали спустя 6 и 24 ч после контакта для количественного определения интерферона- α (IFN- α , ингибирование инфекции HSV, Mikloska Z. et al. (2001) "Alpha and Gamma Interferons Inhibit Herpes Simplex Virus Type 1 Infection and Spread in Epidermal Cells after Axonal Transmission", J. Virol, 75(23), 11821-11826), - β (IFN- β ; inhibition of HSV replication; Sainz Jr. B. et al. (2002) "Alpha/Beta Interferon and Gamma Interferon Synergize To Inhibit the Replication of Herpes Simplex Virus Type 1", J. Virol, 76(22), 11541-11550) и интерлейкина 6 (IL-6, маркер воспаления).

Положительным контролем эксперимента был физиологический раствор (NaCl 100 мМ).

Не отмечено отсутствия изменения базового уровня IFN- α и IFN- β в клетках.

В зависимости от биоптатов и доноров и соответственно от травмы при хирургической операции и экспериментальной манипуляции:

Через 6 ч после контакта (фиг. 6 и 7)

с NaCl в качестве контроля, продукция базового IL-6 277 ± 11 до $2,866 \pm 206$ пг/мл.

со смесью 1, ингибирование продукция IL-6 относительно контроля NaCl, от 0 до $1,015 \pm 17$ пг/мл.

Через 24 ч после контакта (фиг. 6 и 7):

с контролем NaCl, базовая продукция IL-6 - $1,485 \pm 37$ до $7,454 \pm 199$ пг/мл.

со смесью 1, ингибирование продукции IL-6 относительно контроля NaCl, 84 ± 15 до $5,910 \pm 29$ пг/мл.

Выводы:

гетерогенность продукции и избыточной продукции (6 и 24 ч соответственно) для IL-6 после контакта NaCl и смеси 1 (фиг. 6),

гетерогенное ингибирование продукции IL-6 после контакта со смесью 1 (5 мг/л активного вещества), которое составляет в среднем 28% спустя 6 ч и 19% спустя 24 ч, относительно контроля NaCl (фиг. 6).

По этому ингибированию продукции смесь 1 обладает противовоспалительными свойствами (фиг. 7).

Пример 8. Разложение в плазме и время полужизни.

Одним из доноров радикалов (в основном HO_2^\bullet , который имеет продолжительность жизни до нескольких секунд и заметный индекс проникновения в клетки) в реакции типа Фентона-Габера-Вейса активного вещества MoO_4^{2-} смеси 1 является H_2O_2 . Деградацию этого индикатора отслеживают для оценки скорости потребления смеси 1 или ее дезактивации.

Методика.

Смесь 1 (68,9 мкМ или конечная концентрация 14,2 мкг/л) инкубировали в свежей человеческой плазме. Кинетику исчезновения H_2O_2 наблюдали по пероксидазной реакции на аликвотах, отобранных в последующие моменты времени.

Результаты:

В среднем ($n=10$) процент деградации вещества-индикатора смеси 1 в плазме человека при комнатной температуре после времени контакта 2 мин составляет $85,3 \pm 9,4\%$, $74 \pm 15,2\%$ в первую минуту.

В первую минуту "Время деградации 50%" или $\text{DT}_{50}=0,812$ мин для раствора смеси 1 при исходной концентрации 68,9 мкМ активного вещества и исходном содержании 1 мМ H_2O_2 .

Скорость деградации $K_{\text{сH}_2\text{O}_2}$: ≈ 740 мкмоль смеси 1 при начальной концентрации 1 мМ H_2O_2 /мин/л плазмы или $K_{\text{сMoO}_4^{2-}}$: $\approx 51,0$ мкмоль смеси 1 при начальной концентрации 68,9 мкМ активного вещества MoO_4^{2-} /мин/л плазмы, в первую минуту инкубации при комнатной температуре.

Для образца 200 мкл смеси 1 при 24,3 мкМ (5,0 мг/л) активного вещества или 353 мМ (12 г/л) индикатора H_2O_2 в рамках местного терапевтического применения имеется ≈ 5 нмоль активного вещества

MoO₄²⁻ или 70 мкмоль индикатора H₂O₂. Этот образец в 1 л плазмы деградирует в пределах ≈0,1 мин.

Пример 9. Ограниченная гематотоксичность в периферической крови.

Целью данного исследования является оценка гематотоксичности смеси 1 (24,3 мкМ или конечная концентрация 5,0 мг/л) после инкубации 2, 3 и 5 мин в периферической крови человека. Токсичность, при которой наблюдается гемолиз, оценивали по основным параметрам крови, то есть количеству эритроцитов, лейкоцитов, гематокриту, тромбоцитам, среднему объему глобулы и уровню гемоглобина.

Выводы:

Гематологические параметры, относящиеся к количеству эритроцитов, лейкоцитов, гематокриту, среднему объему глобулы и уровню гемоглобина, не изменялись после инкубации в течение 5 мин со смесью согласно изобретению.

Количество тромбоцитов изменялось при контакте со смесью 1 от -35% сразу же после добавления, составив -69% через 5 мин.

Пример 10. Ограниченное чрескожное проникновение смеси в соответствии с изобретением; абсорбция, биофаза и биодоступность (OECD 428, EMEA, Human Guideline, 2001).

Используемая смесь 1 была в пять раз более концентрированной (смесь 1×5), чтобы показать наименьшее проникновение веществ. Целью этого исследования была оценка (контроль, t₀, t₂ мин, T₆₀ мин) проникновения смеси 1×5, а также индикатора H₂O₂ через непатологические биоптаты кожи человека.

Эту процедуру применяли к трем типам субстратов: общие биоптаты, рассеченные биоптаты в эпидермисе, с одной стороны, и в дерме, с другой стороны.

Методика:

Были протестированы 12 биоптатов от 2 доноров (измерения в каплях, нанесенных на лоскут [30 мкл] и в среде ниже последней [800 мкл]) в соответствии с обоими методами (табл. 4): (i) кварцетиновым методом, который оценивает окислительно-восстановительную эффективность смеси 1×5; и (ii) пероксидазным, который определяет концентрацию индикатора H₂O₂.

Капля (30 мкл), нанесенная на биоптаты и эпидермальные и дермальные лоскуты, в 5 была раз более концентрированной по содержанию активного вещества (121,5 мкМ или 25,02 мг/л) и индикатора (1,77 М или 60 г/л), чем терапевтический состав (24,3 мкМ или 5,0 мг/л и 352,8 мМ или 12 г/л соответственно). В 30 мкл нанесенной смеси 1×5 содержалось 3,65 нмоль или 750 нг активного вещества и 53 мкмоль или 1,8 мг индикатора.

Результаты.

Таблица 4

	Опыт	Анализ	Биоптат*	Эпидермис*	Дерма*
Капля	1	Окислительно-восстановительная эффективность	От -1,4 до -10,5	От -5,7 до -23,9	НТ
	2	H ₂ O ₂ индикатор	От -16,5 до -57,7	От -72,5 до -99,9	-99,6
Среда	3	Окислительно-восстановительная эффективность	От +3,7 до +9,0	От +0,8 до +80,6	От +44,5 до +100
	4	H ₂ O ₂ индикатор	От < +0,001** до +0,09	От +0,38 до +1,7	От +0,16 до +0,46

* - в % по отношению к t₀ (-: снижение, +: повышение);

** - предел обнаружения.

Низкое или умеренное снижение (опыт 1) окислительно-восстановительной эффективности смеси 1 наблюдалось в капле поверх лоскута (от -1,4 до -23,9%).

Умеренное или значительное снижение (опыт 2) количества индикатора H₂O₂ из смеси 1 наблюдалось в капле поверх лоскута (от -16,5 до -99,9%).

Наблюдалось легкое или значительное повышение (опыт 3) окислительно-восстановительной эффективности среды под лоскутом. Оно зависело от лоскута и от его типа. В полном биоптате это повышение из-за чрескожного проникновения было низким. В среднем оно составляло 6,35% и соответствовало проникновению 232 пмоль (47,6 нг) активного вещества из смеси 1. В случае эпидермиса или дермы это увеличение сильно меняется (от 0,8 до 100%). Это, скорее всего, связано с различиями в гистологических структурах (например, из-за пор, орошения кожи кровью, окончаний эпидермальных нервов).

Увеличение от не определяемого до незначительного (опыт 4) количества индикатора H₂O₂ в среде под лоскутом наблюдалось независимо от типа лоскута (от <+0,001 до 1,7%). В случае полного биоптата это увеличение из-за чрескожного прохождения было особенно низким (от 0,53 до 47,7 нмоль, то есть от <0,018 до 1,62 мкг). В случае эпидермиса или дермы это увеличение в среднем было низким (1,04 и 0,31%, т.е. 0,55 и 0,16 мкмоль или 18,7 и 5,6 мкг соответственно).

Выводы:

Существует независимость тканей (поглощения, дезактивации, проникновения) от двух параметров, которые считаются типичными для смеси 1, являющихся окислительно-восстановительной эффективностью, обусловленной активным веществом, и дозой пероксидного индикатора, донора радикалов.

При анализе полного биоптата показатель проникновения смеси 1 соответствует толщине лоскута, то есть от 1 мм (средняя толщина эпидермиса) до 2 мм.

Эпидермис содержит много нервных окончаний, которые могут быть центром аксонального высвобождения герпетических вирионов у пациента. Они являются мишенями смеси 1 так же, как инфицированные эпидермальные клетки или клетки до потенциальной инфекции. Учитывая последовательность двух тканей, биофаза смеси 1 почти строго зависит от толщины эпидермиса (1 мм) и полностью достигается для максимального поглощения тканью-мишенью.

Принимая во внимание, что только одна дерма васкуляризована, вновь самое большее 80,6% окислительно-восстановительной эффективности смеси 1 можно найти при ее контакте и при 1,7% индикатора. В этих экспериментальных условиях биодоступность смеси 1×5 составляет 2,94 нмоль или 605 нг активного вещества и 0,9 мкмоль или 30,6 мкг пероксидного индикатора.

В исследовании генотоксичности *in vitro* с тестом Эймса смесь по изобретению и ее метаболиты не были мутагенными в присутствии активатора S9 (5/5 штаммов *Salmonella*), она была мутагенной на 1 штамме из 5 при его отсутствии.

При местном применении на коже, при стимуляции или без стимуляции, смеси согласно изобретению (24,3 мкМ или 5,0 мг/л активного вещества) не отмечено какой-либо токсичности, связанной с высвобождением.

При изучении буккального и вагинального раздражения смесь согласно изобретению (24,3 мкМ или 5,0 мг/л) не вызывала раздражения (оценка 0/16) или вызывала очень слабое раздражение (оценка 1/16) соответственно.

В высокочувствительном исследовании раздражения на хориоаллантаиной мембране куриного яйца смесь 1 (18,23 и 24,3 мкМ или 3,75 и 5,0 мг/л) вызывала умеренное раздражение (индекс раздражения или ИР=6,8±0,4 и 6,3±0,21 соответственно).

В исследовании острой токсичности при нанесении на кожу смесь в соответствии с изобретением в дозах 25,0 и 31,3 мкг/кг активного вещества с содержанием 60 и 75 мг/кг H₂O₂ индикатора соответственно хорошо переносилась без каких-либо симптомов с "Максимальной переносимой дозой" (MTD) и "Максимальной дозой без какого-либо наблюдаемого отрицательного эффекта" (MDWNODE) или "Максимальной дозой, не вызывающей обнаруживаемого вредного воздействия на здоровье человека" (NOAEL) 31,3 мкг/кг активного вещества и 75 мг/кг индикатора.

В исследовании острой токсичности с внутривенным введением смесь в соответствии с изобретением в дозах 10,4 и 12,5 мкг/кг активного вещества, содержащегося в 25 и 30 мг/кг H₂O₂ индикатора соответственно, переносилась без каких-либо заметных симптомов с "Максимальной переносимой дозой" (MTD) 12,5 мкг/кг активного вещества.

Пример 11. Приемлемая токсичность смеси в соответствии с изобретением.

I. Мутагенность *in vitro* (тест Эймса - OECD 471).

Целью данного исследования была оценка мутагенной активности активной смеси согласно изобретению (смеси 1) и ее метаболитов (продуцированных S9 фракцией печени крысы) на штаммах *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA102 и TA1535.

Выводы:

Без какой-либо системы активации S9 активная смесь (7,7 или 2,43 мкМ, то есть 1,58 или 0,50 мг/л) в соответствии с изобретением и ее метаболиты не оказывали мутагенного воздействия на линии TA97a, TA98, TA100 и TA1535.

С системой активации S9 активная смесь (смесь 1×5: 121,5 мкМ или 25,02 мг/л) в соответствии с изобретением и ее метаболиты не оказывали какого-либо мутагенного воздействия на линии TA97a, TA98, TA100, TA102 и TA1535.

Без системы активации S9 активная смесь в соответствии с изобретением не являлась мутагенной для штамма TA102 при 0,50 мг/л.

В этом тесте *in vitro* мутагенный эффект активной смеси и ее метаболитов в соответствии с изобретением ограничен для ее использования (штамм TA102).

II. Тест кожной сенсibilизации после индукции (на самках хомяков, OECD 406, ISO 10993-10: 2013 и ICH Memorandum SCCP 2005).

Согласно протоколу Magnusson & Kligman (Magnusson B. et al. (1969) "The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test", J. Invest. Dermatol., 52(3), 268-276) исследовали сенсibilизирующий потенциал на коже самок хомяков в соответствии с тремя протоколами.

Протокол 1: Определение предельной переносимой дозы.

Концентрации смеси 1 от 1,25 до 20,00 мг/л активного вещества, содержащегося в 3-48 г/л H₂O₂ индикатора соответственно, в 1 мл "пластыря" наносили на 24 ч на боковую поверхность животных, а затем наблюдали животных.

Концентрация смеси 1 при 10 мг/л активного вещества, содержащегося в 24 г/л индикатора, хорошо переносится и вызывает умеренное раздражение.

Концентрация смеси 1 при 5,0 мг/л активного вещества, содержащегося в 12 г/л H₂O₂ индикатора, хорошо переносится и считается максимальной дозой, не вызывающей раздражения.

Протокол 2. Определение предельной переносимой дозы после индукции путем подкожной инъек-

ции.

Концентрации смеси 1 от 5 до 10 мг/л активного вещества, содержащегося в 12 до 24 г/л H_2O_2 индикатора соответственно, вводили (по 100 мкл) подкожно. Через 8 дней (первая индукция) осуществляли первое местное применение в виде "пластыря" размером 1 мл. Спустя 27 дней (вторая индукция) осуществляли второе местное применение в виде "пластыря" размером 1 мл. Наблюдения проводились через 29 дней.

Концентрация смеси 1 5 мг/л активного вещества, содержащегося в 12 г/л индикатора, хорошо переносится и не вызывает раздражения.

Протокол 3. Изучение раздражения, вызванного стимуляцией и местным применением смеси 1 с 5 мг/л активного вещества, содержащегося в 12 г/л H_2O_2 индикатора.

100 мкл смеси 1 с 5,0 мг/л вводили подкожно. Через 4 дня область инъекции стимулировали 10%-ным раствором додецилсульфата натрия (SDS) перед местным применением смеси 1 (1 мл) в "пластыре". Через 6 дней проводили второе местное применение. На 21 день (индукция) осуществляли местное применение смеси 1 (1 мл) в "пластыре" с концентрациями от 6,26 до 10 мг/л активного вещества, содержащегося в 15-24 г/л индикатора.

Смесь 1 при 5,0 мг/л активного вещества, содержащегося в 12 г/л индикатора, хорошо переносится, а показатель сенсibilизации кожных покровов композицией составил 0/3.

Выводы.

Смесь 1 при 5,0 мг/л активного вещества не обладает раздражающим эффектом. Макроскопического изменения кожи животных не наблюдалось. Соответственно нет необходимости в каком-либо патологоанатомическом исследовании.

III. Буккальное и вагинальное раздражение (на самках кроликов, OECD(99)20, -21, -23 -24, -(95)115, -(02) 9 и ISO-10993-10: 2013)

Целью этого исследования была оценка вагинальной и буккальной переносимости смеси 1 при 5,0 мг/л активного вещества, содержащегося в 12 г/л индикатора, в соответствии с воздействием, соответствующим 5-дневному терапевтическому применению у человека.

С 0 до 6 дней, каждые 24 ч, у животных применяли смесь (1 мл) буккально и вагинально. На 7-й день животных осматривали и измеряли их массу тела.

Выводы.

Концентрация смеси 1 5,0 мг/л активного вещества хорошо переносится. Индекс раздражения при буккальном и вагинальном применении составляет 0/16 и 1/16 соответственно. Следовательно, нет необходимости в патологоанатомическом исследовании.

IV. Тест на раздражение глаз (ICCVAM App B).

Используемый тест на раздражение глаз был тестом, заменяющим HET-CAM (тест на хориоаллантаоисной мембране куриного яйца), опубликованным в Official Journal от 26/12/1996. Рекомендован IC-CVAM.

Хотя этот особо чувствительный метод не был официально утвержден ЕС, он принят для использования с целью нахождения веществ даже со слабым раздражающим эффектом, включая те, которые являются глазными раздражителями, для того, чтобы присвоить им маркировку R41 (2002).

Вкратце, способ состоит в применении испытуемого вещества смеси 1 при 3,75 и 5,00 мг/л активного вещества в 9 и 12 г/л индикатора соответственно на хориоаллантаоисной мембране оплодотворенного куриного яйца. Через 0,5; 2 и 5 мин после контакта наблюдают и оценивают три следующих критерия: кровоизлияние, коагуляцию и гиперемию.

Результаты и выводы.

Смесь 1 при 3,75 или 5,00 мг/л активного вещества может быть классифицирована как умеренно раздражающая (индекс раздражения или HPS=6,8±0,4 и 6,3±0/21 соответственно), то есть она вызывает небольшой лизис (показатель тяжести=1/3) сразу после введения или через 30 с после контакта, без кровоизлияния или коагуляции.

С учетом значения Q (отношения индексов между показателями для положительных веществ эталонного NaOH 0,1M [IP=15±3] и 1% SDS [10±2] по сравнению со смесью 1), Q против NaOH=0,51-0,54, и Q против SDS=от 1,10 до 1,18 для смеси 1 с содержанием активного вещества 3,75 и 5,00 мг/л соответственно.

Соответственно, что касается этого теста с повышенной чувствительностью, который намного более значителен, чем уже имеющийся высокоэффективный тест на вагинальное раздражение у самок кроликов, смесь 1 считается слегка (3,75 мг/л) или умеренно (5,00 мг/л) раздражающим веществом.

V. Исследование острой токсичности путем кожного применения и внутривенной инъекции - максимальные переносимые дозы (MTD) и доза без какого-либо наблюдаемого токсического эффекта (NO-AEL) (крысы, OECD 474, ICH M3(R2) и S6(R1)).

Целью данного исследования является определение максимальной переносимой дозы (МПД) смеси 1 путем кожного применения (1 мл) или инъекции в хвостовую вену (5 мл/кг). Клинические наблюдения проводили до 14 дня.

Выводы протокола кожного применения.

Смесь 1 имеет дозу 50 мкг/кг активного вещества (1 мл-10 мг/л), которая хорошо переносится. Наблюдалась небольшая эритема обработанной области, а также появление мелких корочек, которые исчезли в течение 2 дней. Никакого раздражения не наблюдалось.

Такие же пропорционально более легкие симптомы наблюдались при применении смеси 1 из 37,5 мкг/кг активного вещества (от 1 мл до 7,5 мг/л).

Смесь 1 в дозах 25,0 и 31,3 мкг/кг активного вещества (1 мл при 5,0 и 6,26 мг/л) хорошо переносится. На 14 день не наблюдалось кожных, метаболических или физиологических симптомов.

МПД смеси 1 при кожном применении у крыс составляет 31,3 мкг/кг активного вещества (от 1 мл до 6,26 мг/л).

NOAEL (доза без какого-либо наблюдаемого токсического эффекта) смеси 1 при кожном применении у крыс составляет 31,3 мкг/кг активного вещества (1 мл при 6,26 мг/л).

Выводы протокола инъекции в хвостовую вену:

Трудность внутривенного введения смеси 1 связана не с собственной токсичностью по изобретению, а с ее разложением при контакте с кровью, особенно приводящему к продукции молекулярного кислорода, который может вызвать эмболию. Этическая предельная доза (3 крысы), демонстрирующая обратимую остановку дыхания, составляет 14,6 мкг/кг активного вещества (5 мл/кг смеси 1 при 2,92 мг/л). Никаких признаков токсичности не было зарегистрировано до 14 суток.

Смесь 1 переносится после внутривенной инъекции при 12,5 мкг/кг активного вещества (5 мл/кг смеси 1 при 2,5 мг/л). Физиологические затруднения (движения и проблемы с дыханием) наблюдались у животных в момент инъекции. Никаких признаков токсичности не было зарегистрировано до 14 суток.

Те же симптомы, пропорционально менее значимые, наблюдались после внутривенной инъекции при 10,4 мкг/кг активного вещества (5 мл/кг смеси 1 при 2,1 мг/л). Не сообщалось о клинических признаках или изменении кривой массы. Никаких признаков токсичности не было зарегистрировано до 14 суток. Макроскопическое наблюдение органов спустя 14 суток после вскрытия ничего не выявило.

MTD смеси 1 при инъекции в хвостовую вену составляет 12,5 мкг/кг активного вещества (5 мл/кг смеси 1 при 2,5 мг/л).

VI. Изучение генотоксичности *in vivo* путем поиска генерации микроядер после внутривенной инъекции смеси 1 (самцы и самки крыс, OECD 474 и ICH S2(R1)).

Самкам крыс (n=5) и самцам крыс (n=5) вводили (две обработки с интервалом 22-26 ч, 5 мл/кг) контроль на основе воды ВЭЖХ качества (внутривенно), положительный контроль - циклофосфамид при 5 и 10 мг/кг, внутривенно, этилметансульфонат при 100 и 150 мг/кг (интраперитонеально) и смесь 1 при 1,46; 4,17 и 12,5 мкг/кг активного вещества (внутривенно).

Отмечалась заболеваемость, смертность, масса тела животных и клинические параметры (температура, состояние кожи, шерсти, глаз, слизистых оболочек, секреция и экскреция, респираторная и неврологическая функции, движения и позы). Спустя 36 и 48 ч после второго применения кровь животных собирали и анализировали посредством проточной цитометрии (контроль токсичности: снижение доли незрелых эритроцитов (CD-71-позитивных). Долю микроядерных незрелых эритроцитов (ретикулоцитов) оценивали по 4000 наблюдений на образец крови. Каждая популяция крыс (n=10) для каждого испытуемого вещества представляла собой 40000 наблюдений (табл. 5).

Таблица 5

Вещество	Мг/кг	Пол	n	Ретикулоциты (%)	Микроядерные ретикулоциты (%)
До лечения	#	Самцы	5	4,39±0,92	0,15±0,09
		Самки	5	2,60±0,57	0,17±0,07
Отрицательный контроль, вода	#	Самцы	5	5,17±1,47	0,32±0,31
		Самки	5	3,82±0,29	0,12±0,04
Положительный контроль 1 Циклофосфамид	5	Самцы	5	3,99±0,49	0,56±0,17
		Самки	5	2,41±0,54	0,40±0,13
	10	Самцы	5	1,95±0,59	1,62±0,29
		Самки	5	1,30±0,43	1,02±0,26**
Положительный контроль 2 Метансульфонат	100	Самцы	5	1,41±0,32	0,68±0,35**
		Самки	5	1,86±0,25	0,48±0,16**
	150	Самцы	5	1,33±0,34	0,81±0,48**
		Самки	5	0,45±0,33	0,59±0,26**
Смесь 1	1,46 x 10 ^{-3#}	Самцы	5	5,32±0,76	0,10±0,02
		Самки	5	3,35±0,46	0,09±0,03
	4,17 x 10 ^{-3#}	Самцы	5	4,82±0,41	0,11±0,03
		Самки	5	3,35±0,83	0,09±0,02
	12,5 x 10 ^{-3#}	Самцы	5- 3*	4,79±0,16	0,22±0,12
		Самки	5- 1*	3,40±0,19	0,09±0,02

* - животные, умершие при первом применении из-за эмболии, обусловленной высвобождением молекулярного кислорода из смеси 1 в контакте с кровью;

** - статистически отличающиеся от контрольной группы;

- в активном веществе MoO₄²⁻.

Вывод: по сравнению с контрольными группами (положительными и отрицательными) смесь 1 не обладает какой-либо генотоксичностью за счет индукции выработки микроядерных ретикулоцитов после внутривенной инъекции у крыс (n=10, включая 5 самцов и 5 самок) в диапазоне 1,46; 4,17 и 12,5 мкг/кг

активного вещества.

Пример 12. Сравнение с другими композициями.

В настоящем примере явно показано влияние композиции, в частности, окислительно-восстановительного потенциала на

1 - роль кальция в катализе, подобном реакции Фентона/Габера-Вейса, для тестируемых композиций;

2 - наличие разницы между тремя композициями 5,0 мг/л активного вещества.

S1: смесь 1,

S2: композиция согласно US 6660289,

S3: композиция согласно WO 2010/004161.

Протокол 1 (табл. 6 и 7):

2 измеренных параметра: (i) pH, (ii) окислительно-восстановительный потенциал;

катализатор CaCl_2 (1 М, в H_2O): добавление в конечной концентрации 24 мМ;

кинетики: начальная (T0), 1, 2, 3 мин (T1, T2, T3) после добавления CaCl_2 при перемешивании.

Результаты и обсуждение.

Таблица 6

Раствор S1	T0	CaCl_2 24 мМ	T1	T2	T3	Среднее значение (между T1 и T3)	$\Delta/T0$
pH	4,70		4,58	4,59	4,59	4,59 за 3 мин	-0,11
Окислительно-восст. потенциал E° (мВ)	359	↓ at T0	383	383	383	383 за 3 мин	+24
Раствор S2	T0	CaCl_2 24 мМ	T1	T2	T3	Среднее значение (между T1 и T3)	$\Delta/T0$
pH	2,85		2,65	265	2,66	2,65 за 3 мин	-0,20
Окислительно-восст. потенциал E° (мВ)	437	↓ at T0	479	475	474	476 за 3 мин	+39
Раствор S3	T0	CaCl_2 24 мМ	T1	T2	T3	Среднее значение (между T1 и T3)	$\Delta/T0$
pH	3,01		2,86	2,87	2,87	2,87 за 3 мин	-0,14
Окислительно-восст. потенциал E° (мВ)	414	↓ at T0	465	464	464	464 за 3 мин	+50

Значение pH кожи составляет от $4,93 \pm 0,45$ до $5,12 \pm 0,56$. Вагинальное значение pH обычно составляет порядка 4,50 и может достигать до 6,00 при менопаузе.

В раствор S1 добавлен буфер для pH порядка показателей, характерных для кожи человека и слизистых оболочек. Это значение pH остается относительно постоянным до 3 мин контакта после итогового добавления 24 мМ CaCl_2 . Наблюдается умеренное увеличение E° , которое частично может быть связано с добавлением хлора CaCl_2 ;

кислое значение pH усиливает цитотоксическое перекисное окисление липидов, опосредованное железом.

В раствор S2 не добавлен буфер. Его значение pH не очень подходит для контакта с кожей или слизистой оболочкой (включая вероятное разрушение симбиотической микрофлоры в терапевтическом применении). Это значение pH остается относительно постоянным до 3 мин контакта после добавления итогового 24 мМ CaCl_2 . Наблюдается увеличение, по меньшей мере, до менее умеренного значения по сравнению с E° S1, которое частично может быть связано с добавлением хлора CaCl_2 .

В раствор S3 не добавлен буфер. Его значение pH не очень подходит для контакта с кожей или слизистыми оболочками (включая вероятное разрушение симбиотической микрофлоры в терапевтическом применении). Это значение pH остается относительно постоянным до 3 мин контакта после добавления итогового 24 мМ CaCl_2 . Наблюдается значительное увеличение E° (+50 мВ), которое частично может быть связано с добавлением хлора CaCl_2 , но с учетом разницы в увеличении потенциала по сравнению с S1 и S2, вероятно, это не является единственным фактором.

Что касается ионов Fe in situ, то при кислом pH (<2,33) окислительно-восстановительный потенциал составляет порядка 400 мВ, и Fe находится в трехвалентной форме, то есть в самой цитотоксичной форме. При pH порядка 4,5 окислительно-восстановительный потенциал имеет величину порядка 300 мВ, Fe гемоглобина находится в двухвалентной форме, Fe плазмы образует комплекс с трансферрином в трехвалентной форме.

При pH растворов S2 и S3 оксид железа из $\text{Fe}(\text{OH})_3$ является очень неблагоприятным. Соответственно реакции Фентона-Габера-Вейса являются не очень эффективными.

Величина потенциала пары $\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}$ (тип Фентона) равна $E^\circ = 1,19 - 0,18 \times \text{pH}$.

Таблица 7

	Активное вещество (мг/мл)	pH	$E^\circ_{\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}}$	$E^\circ_{\text{раствора}}$ (мВ)
S1	5,0	4,70	344	354
S2	5,0	2,80	686	428
S3	5,0	3,00	650	418

* - уровень клеток с железом in situ.

Согласно этому исследованию есть подтверждение, что пара $\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}$ является неблагоприятной. Даже если окислительно-восстановительный потенциал этой пары улучшен (418-428 мВ), он остается слишком значительным для контакта с клеткой.

- трансмембранный потенциал клетки животного является отрицательным (≈ -70 мВ). Чем более значительным является окислительно-восстановительный потенциал раствора, тем больше будет изменений трансмембранного потенциала и больше будет индукция клеточного окислительного стресса (генная индукция апоптоза, маршрутов eNOS и т.д.) с одновременной индукцией притока кальция, который усиливает значительный клеточный стресс, уже вызванный растворами 2 и 3.

Соответственно рН и окислительно-восстановительный потенциал композиции S2 и особенно окислительно-восстановительный потенциал композиции S3 являются, скорее всего, цитотоксическими. Оба этих раствора S2 и S3 не могут быть пригодны для терапевтического использования.

Протокол 2 (табл. 8).

Концентрация кальция в клетке и в плазме составляет от 2 до 3 мМ. Этот протокол основан на терапевтическом использовании композиций.

1-й измеренный параметр: остаточное количество пероксидов (H_2O_2 , перуксусная кислота; диапазон испытаний Quantofix от 0 до 25 мг/л);

катализатор $CaCl_2$ (1 М, в H_2O): добавление в конечной концентрации 1,25; 2,5; 10; 25 и 50 мМ;

конечный объем: 1 мл=0,950 мкл тестируемого раствора+0,05 мкл разведения $CaCl_2$. Коэффициент разбавления тестируемого раствора 1,05. Конечная концентрация тестируемого раствора 11,4 г/л (исходная 12 г/л) индикатора H_2O_2 , содержащего 4,76 мг/л активного вещества (исходная 5,00 мг/л);

кинетика: через 5 мин после добавления $CaCl_2$ при перемешивании.

Результаты

Таблица 8

Опыт	Испытуемый раствор	Итоговый $[CaCl_2]$ (мМ)	$[перекиси]_{итоговые}$ (мг/л)
1	S1	50	>>25
2	S1	25	10-25
3	S1	10	10
4	S1	2,5	5-10
5	S1	1,25	\approx 25
6	S2	2,5	>25
7	S3 (WO/2010/004161)	2,5	>25
8	S3 (WO/2010/004161)	1,25	\approx 25

Деактивация композиций S1 за 5 мин контакта с 2,5 мМ $CaCl_2$ (физиологическая концентрация) соответствует снижению перекиси в 1,500 раз (опыт 4), т.е. от 12 г/л до 8 мг/л индикатора и от 5,00 мг/л до 3,33 мкг/л активного вещества.

Сравнительные выводы относительно составов S2 и S3.

Раствор S2 независимо от используемого металла несовместим с терапевтическим применением по причине

его не поддающегося действию буфера рН для сохранения его возможностей;

его цитотоксического окислительно-восстановительного потенциала;

его относительной независимости от кальциевого катализа,

его цитотоксичности в физиологических условиях из-за H_2O_2 и перуксусной кислоты (в дополнение к присутствию, например, ионов Ag^+ , обладающих необратимой цитотоксичностью);

из-за того, что при использованных экспериментальных условиях не существует катализа, подобного реакции Фентона-Габера-Вейса, поэтому нет продукции реакционноспособных радикалов для терапевтического использования.

Раствор S3 независимо от используемого металла и хелатирующей пары, описанной в заявке на патент WO 02010/004161, непригоден для терапевтического применения по причине

его рН, несовместимого с ВАРТА;

его цитотоксического окислительно-восстановительного потенциала;

его относительной независимости от кальциевого катализа;

его цитотоксичность в физиологических условиях из-за H_2O_2 и перуксусной кислоты;

из-за того, что при использованных экспериментальных условиях не существует катализа, подобного реакции Фентона-Габера-Вейса, поэтому нет продукции реакционноспособных радикалов для терапевтического использования.

Напротив, химическая модель реакции композиции S1 в соответствии с изобретением является правильной из-за ее дестабилизации кальцием.

Для композиции S1 выбор

рН,

буферной пары (добавление одного элемента пары: уксусной кислоты, поскольку перуксусная кислота в небольшом количестве продуцируется *in situ*),

переходного металла и его валентности, совместимых с реакциями, подобными реакциям Фентона-Габера-Вейса или нет,

пары хелатирующих агентов (совместимость между ними с $Kd_{Ca^{2+}}$ и Kd_{Mo} , $Kd_{Fe^{2+}/Fe^{3+}}$ в "каскаде"),

отсутствия проникновения в клетки хелатирующих агентов,

активации комплекса раствора S1 кальцием или другими существующими ионами металлов *in situ*, в физиологических дозах и рН (важность выбора хелатирующих агентов), при окислительно-

восстановительном потенциале, существенно ограничивающем окисление липидов (незначительная продукция Fe(III)) и мгновенную генерацию проникающих реактивных радикалов в небольшом диапазоне без накопления, делают эту композицию совместимой с терапевтическим использованием.

Раствор S1 очень сильно деградирует при физиологических концентрациях кальция с минимальным значением 2,5 мМ. Уменьшение (1,25 мМ) или увеличение (от 10 до 50 мМ) этой нефизиологической концентрации кальция сильно изменяет эту деградацию перекисей из-за реакций Фентона-Габера-Вейса путем смещения равновесий (закон массового действия). Химический комплекс, соответствующий раствору S1, полностью адаптирован к конкретной реакции при постоянном содержании кальция в клетке и плазме.

Пример 13. Пример активной смеси в соответствии с изобретением с комбинацией Mo и La.

Этот пример композиции ("смесь 2") в соответствии с настоящим изобретением получен с использованием молибденовой соли и соли лантана. Готовят композицию с составом согласно табл. 9, выраженным в виде начальной концентрации компонентов.

Таблица 9

Вещества	Смесь по изобретению
Натрия молибдат	20,7 мкМ
Лантана нитрат	11,5 мкМ
ВАРТА	42 мкМ
EGTA	1051,6 мкМ
H ₂ O ₂	353 мМ
CH ₃ COOH/CH ₃ COONa	70 мМ
pH (с помощью NaOH)	4,4 – 5,0
E° _{окисл.-восст.}	300 - 420 мВ

Композиция называется "исходной", поскольку она соответствует концентрациям добавленных реагентов без учета используемого каталитического процесса.

Все вещества, используемые в синтезе и присутствующие в готовом продукте, проверены по спектру ИК-Фурье.

Таблица 10

Продукт	Чистота	Молекулярная формула	№ CAS
Натрия молибдат дигидрат	98-103%	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	10102-40-6
Лантана нитрат гексагидрат	≥99%	La(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	10277-43-7
ВАРТА : (1,2-бис(о-аминофеноксид)этан- N,N,N',N'-тетрауксусная кислота)	≥98%	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₁₀	85233-19-8
EGTA: (этиленгликоль-бис (2-аминоэтилэфир)- N,N,N',N'-тетрауксусная кислота)	≥99%	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀	67-42-5
Перекись водорода	29-31%	H ₂ O ₂	722-84-1
Ледяная уксусная кислота*	99,8- 100,5%	CH ₃ COOH	64-19-7
Натрия ацетат тригидрат	99-101%	C ₂ H ₃ NaO ₂ ·3H ₂ O	5010524
Натрия гидроксид	10 н	NaOH	1310-73-2
Деминерализованная вода	1 мкС	H ₂ O	7732-18-5

Действующим веществом является: (MoO₄)¹⁻, Na⁺ (лантана гидропероксомолибдат).

Молекулярная масса 481,81 г/моль.

Способ получения.

Способ получения идентичен способу для смеси 1 в примере 1, за исключением описанных ниже модификаций:

Готовят два раствора SC:

раствор А - Na₂MoO₄, 2H₂O (источник Mo(VI), 100%) 200 мг (итоговая 2,4 мМ), вода до 340 мл.

Осторожное перемешивание при комнатной температуре.

Раствор В - La(NO₃)₃, 6H₂O (источник La(III), 100%) 200 мг (итоговая 1,4 мМ).

Вода до 340 мл.

Осторожное перемешивание при комнатной температуре.

Раствор А (10 мл) и затем раствор В (10 мл) постепенно вводят в раствор Si2 для получения раствора лантана гидропероксомолибдата S1.

Этап (vii): добавление хелатирующих агентов - получение раствора S4.

Введение ВАРТА (98,8%) - 20 мг/л,

введение EGTA (99,1%) - 400 мг/л.

Значение pH итогового раствора регулируют с помощью NaOH до 4,67.

Итоговое значение E_{o/b}: 380 мВ.

В смеси 2 итоговая концентрация La(MoO₄)¹⁻, Na⁺ составляет 20,8 мкМ.

Пример 14. Оценка окислительно-восстановительной эффективности по изобретению в двойном комплексе молибдата и лантаната на плазме человека.

Чтобы сравнить окислительную эффективность композиций (MoO₄)²⁻ (смесь 1) и La(MoO₄)¹⁻ (смесь 2), обеспечивали контакт композиций с концентрациями, сопоставимыми с концентрациями, описанными на фиг. 3, и ниже тех, которые описаны на фиг. 5, с плазмой человека в течение 2 мин. После вычитания значений экспериментальных холостых проб, особенно в этой зоне концентрации, смеси 1 и 2 со-

гласно изобретению приводили к увеличению продукции *in situ* окисленного кверцетина. Итоговые концентрации MoO_4^{2-} и $\text{La}(\text{MoO}_4)^{1-}$ при анализе составили: 0,00; 3,80; 7,59; 1215 нМ и 0,00; 3,25; 6,50; 1,040 нМ соответственно (фиг. 8).

Разница продукции окисленного кверцетина (максимум около 295 нМ) между двумя композициями (смесь 1 и смесь 2) незначительна. Окислительно-восстановительная эффективность двух композиций в соответствии с изобретением является сопоставимой.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Терапевтически активная композиция для терапевтического лечения инфекций HSV-1 и/ или HSV-2, указанная композиция включает

по меньшей мере одну соль металла, где металл выбран из молибдена (Mo), вольфрама (W), ванадия (V) и золота (Au);

по меньшей мере один хелатирующий агент;

по меньшей мере один источник пероксилирующих радикалов;

по меньшей мере один буферный агент,

где указанная композиция имеет окислительно-восстановительный потенциал от 250 до 550 мВ.

2. Композиция по п.1, где указанная композиция является композицией для местного применения.

3. Композиция по п.1, имеющая окислительно-восстановительный потенциал от 300 до 450 мВ.

4. Композиция по п.1, имеющая окислительно-восстановительный потенциал от 300 до 420 мВ.

5. Композиция по любому из пп.1 -4, где металл из металлата имеет максимальную валентность.

6. Композиция по любому из пп.1-5, где металл является окисленным до максимальной степени окисления.

7. Композиция по любому из пп.1-6, где соль металла является солью молибдена или включает молибден.

8. Композиция по любому из пп.1-7, где соль металла дополнительно содержит соль лантаноида или лантаноид.

9. Композиция по любому из пп.1-8, где соль металла является смесью соли молибдена и соли лантаноида.

10. Композиция по любому из пп.8 и 9, где лантаноид является лантаном.

11. Композиция по любому из пп.1-10, где соль молибдена является пероксо- или гидропероксоединицей.

12. Композиция по любому из пп.1-11, где активное вещество относится к MoO_4^{2-} -типу или его гидропероксоформе.

13. Композиция по любому из пп.1-12, включающая по меньшей мере два хелатирующих агента.

14. Композиция по любому из пп.1-13, где хелатирующий агент (агенты) имеет по меньшей мере три координационных группы на трех концах молекулы (молекул), образующей хелатирующий агент (агенты), где указанные координационные группы разделены цепью по меньшей мере из трех атомов, включающих по меньшей мере атом азота.

15. Композиция или смесь по любому из пп.1-14, где хелатирующий агент (агенты) имеет по меньшей мере три карбоновокислых группы.

16. Композиция по любому из пп.1-15, где хелатирующий агент выбран из ВАРТА, EGTA и любых их смесей.

17. Композиция по любому из пп.1-16, где основной источник пероксилирующих радикалов присутствует в диапазоне концентраций от 200 до 600 мМ.

18. Композиция по любому из пп.1-16, где основной источник пероксилирующих радикалов присутствует в диапазоне концентраций от 300 до 500 мМ.

19. Композиция по любому из пп.1-16, где основной источник пероксилирующих радикалов присутствует в диапазоне концентраций от 340 до 450 мМ.

20. Композиция по любому из пп.1-19, где композиция включает буферный агент, обеспечивающий pH от 4,0 до 5,2.

21. Композиция по любому из пп.1-19, характеризующаяся тем, что композиция включает буферный агент, обеспечивающий pH от 4,4 до 5,0.

22. Композиция по любому из пп.1-19, характеризующаяся тем, что композиция включает карбоновую кислоту в качестве буферного агента.

23. Композиция по любому из пп.1-19, характеризующаяся тем, что композиция включает уксусную кислоту в качестве буферного агента.

24. Композиция по любому из пп.1-23, имеющая окислительно-восстановительный потенциал от 350 до 420 мВ.

25. Способ приготовления композиции, как описано выше в соответствии с любыми из пп.1-24, включающий (i) приготовление буферного раствора (BS), включающего буферный агент, имеющий кислое значение pH; (ii) приготовление раствора комплекса металла (SC), включающего соль оксида метал-

ла; (iii) приготовление первого исходного раствора (Si1), включающего перекись водорода; (iv) приготовление второго исходного раствора (Si2) путем смешивания раствора BS с раствором Si1; (v) приготовление раствора (S1), включающего пероксометаллическое соединение, путем смешивания раствора CS с раствором Si2; (vi) приготовление раствора S2 путем доведения pH раствора S1 основанием, где pH раствора S2 является более щелочным, чем pH раствора BS; (vii) добавление в раствор S2 одного или нескольких хелатирующих агентов; получение композиции, как определено в любом из пп.1-24.

26. Способ приготовления композиции по п.25, где способ также включает стадию (viii) доведение pH.

27. Способ приготовления композиции по п.25 или 26, где способ также включает стадию (ix) доведение объема итогового раствора.

28. Способ по любому из пп.25-27, где перекись водорода присутствует в растворе Si1 в диапазоне концентрации от 200 до 600 мМ.

29. Способ по любому из пп.25-27, где перекись водорода присутствует в растворе Si1 в диапазоне концентрации от 300 до 500 мМ.

30. Способ по любому из пп.25-27, где перекись водорода присутствует в растворе Si1 в диапазоне концентрации от 330 до 460 мМ.

31. Способ по любому из пп.25-30, где буферный агент в растворе BS является буфером из карбоновой кислоты/карбоксилата, а раствор BS имеет отношение перекись водорода/карбоксилат от 20/1 до 1/1.

32. Способ по любому из пп.25-31, где буферный агент в растворе BS является буфером из карбоновой кислоты/карбоксилата, а раствор BS имеет отношение перекись водорода/карбоксилат примерно 5/1.

33. Способ по любому из пп.25-32, включающий измерение окислительно-восстановительного потенциала на этапах (iii)-(ix) и предпочтительно также включающий измерение pH на этапах (iii)-(ix).

34. Способ по любому из пп.25-33, где пероксометаллическое соединение в растворе S1 является пероксомолибденовым соединением.

35. Фармацевтическая композиция, включающая по меньшей мере одну соль молибдена (Mo), по меньшей мере один хелатирующий агент; по меньшей мере один буферный агент и источник пероксидантных радикалов, где указанная композиция имеет окислительно-восстановительный потенциал от 250 до 550 мВ.

36. Фармацевтическая композиция по п.35, где соль металла дополнительно содержит соль лантаноида или лантаноид.

37. Фармацевтическая композиция по п.36, характеризующаяся тем, что лантаноид является лантаном.

38. Фармацевтическая композиция для местного применения, включающая терапевтически активную композицию, как определено в любом из пп.1-24, или терапевтически активную композицию, полученную в соответствии со способом по любому из пп.25-34.

39. Фармацевтическая композиция для местного применения по п.38, включающая от 0,001 до 5 мМ терапевтически активной композиции.

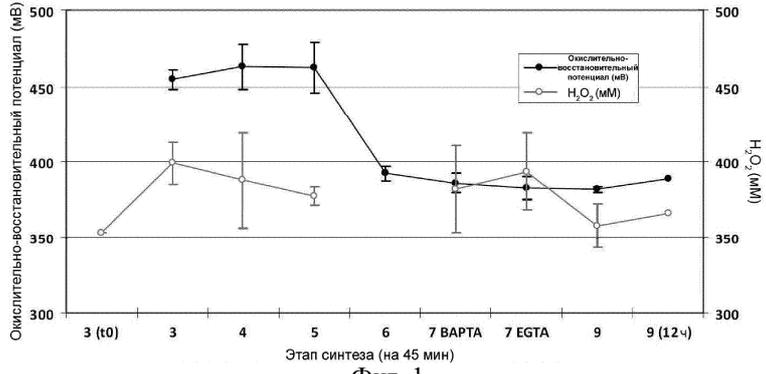
40. Фармацевтическая композиция для местного применения по п.38 или 39, включающая от 0,01 до 2 мМ терапевтически активной композиции.

41. Фармацевтическая композиция для местного применения по п.38 или 39, включающая от 0,02 до 1 мМ терапевтически активной композиции.

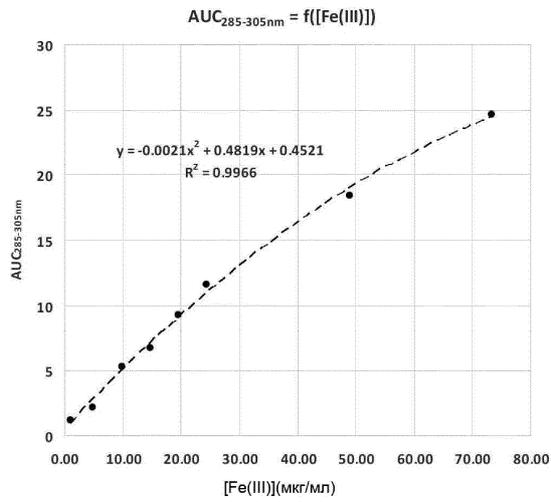
42. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.38-41 в способе терапевтического местного лечения вирусных инфекций HSV-1 и/или HSV-2.

43. Применение фармацевтической композиции, включающая молибден, по меньшей мере один хелатирующий агент, меньшей мере один буферный агент и источник пероксидирующих радикалов, в способе терапевтического местного лечения вирусных инфекций HSV-1 и/или HSV-2, где указанная композиция имеет окислительно-восстановительный потенциал от 250 до 550 мВ.

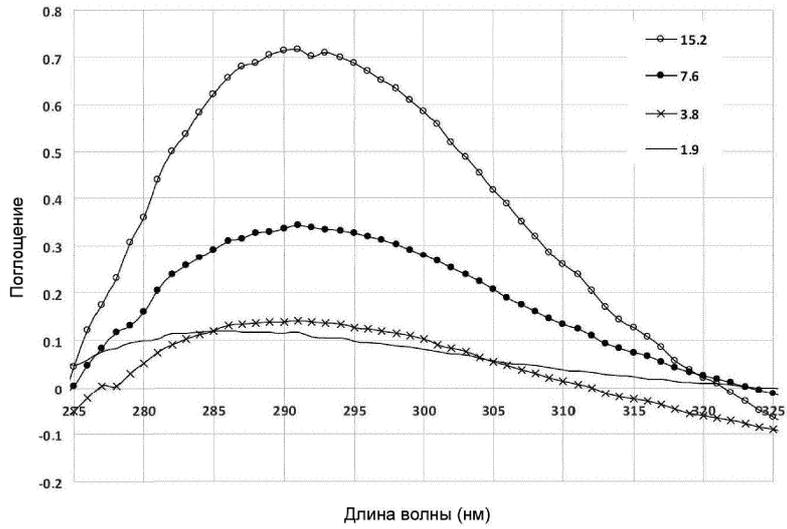
44. Способ терапевтического лечения инфекций HSV-1 и/или HSV-2, включающий применение посредством местного применения субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одну соль металла, где металл выбран из молибдена (Mo), вольфрама (W), ванадия (V) и золота (Au); по меньшей мере один хелатирующий агент; по меньшей мере один буферный агент и источник пероксидантных радикалов, где указанная композиция имеет окислительно-восстановительный потенциал от 250 до 550 мВ.



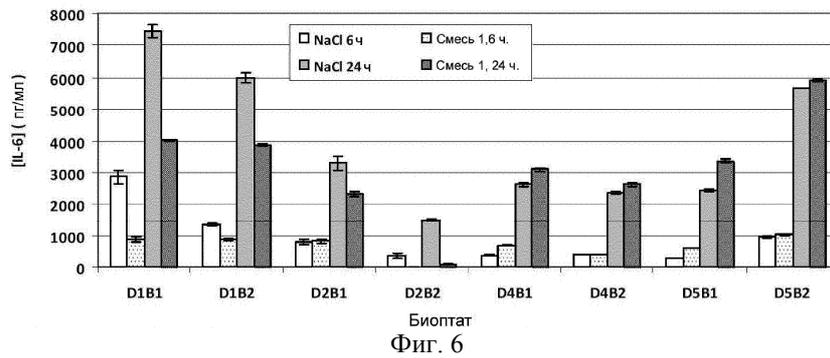
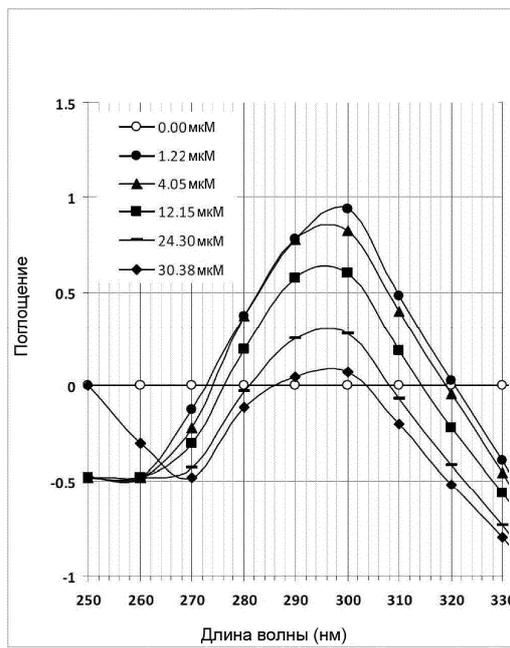
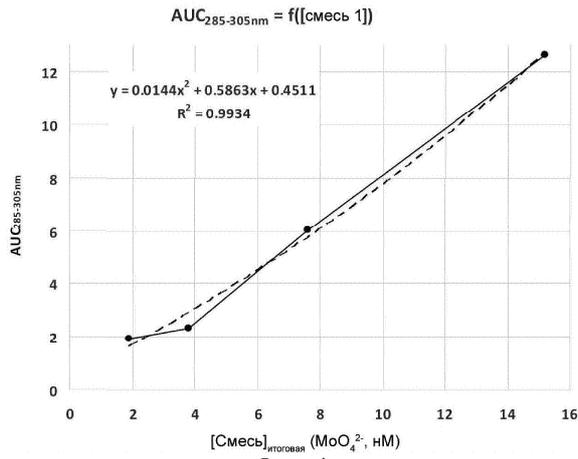
Фиг. 1

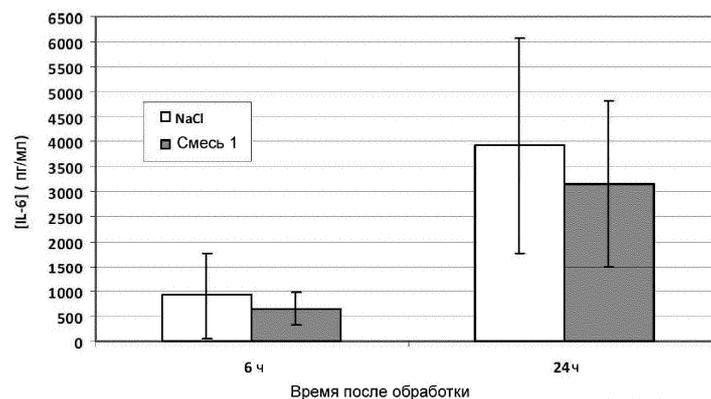


Фиг. 2

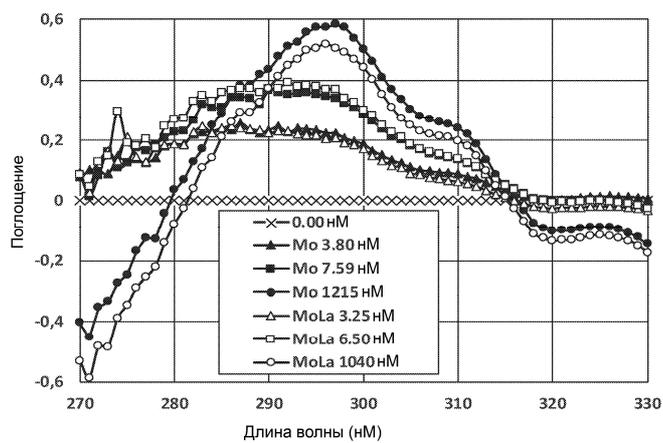


Фиг. 3





Фиг. 7



Фиг. 8

