

**COMPOSICIÓN, PARTICULARMENTE COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PREVENTIVA Y CURATIVA,
A BASE DE PEROXOMETALATO**

La presente invención se refiere a una mezcla activa en un tratamiento terapéutico, comprendiendo dicha mezcla un peroxometalato tal como, por ejemplo, un peroxomolibdato y/o, como por ejemplo, un peroxolantanato.

En particular, la presente invención se refiere a una mezcla activa para el tratamiento preventivo y curativo de infecciones con *Herpesviridae* y en particular, infecciones con *Herpes simplex 1* (HSV-1 o HHV-1) y con *Herpes simplex 2* (HSV-2 o HHV-2). La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dicha mezcla activa, a métodos de preparación así como a sus usos, en particular dentro del alcance de un tratamiento terapéutico.

Estado de la técnica

Entre las patologías infecciosas, las debidas a virus, además de su gravedad variable según sus tipos, que pueden oscilar hasta la muerte del paciente, y con una tasa de morbilidad muy desigual según las poblaciones y los tiempos, plantean un importante problema terapéutico. Este agente causal requiere un huésped celular cuyo metabolismo y constituyentes utiliza para multiplicarse, de ahí la dificultad de erradicación mediante un tratamiento respetuoso del tejido sano con respecto al infectado, o incluso un tratamiento preventivo.

Entre las infecciones virales que pueden afectar a los humanos, las que tienen *Herpesviridae* son actuales, altamente contagiosas y endémicas. Esta familia de virus con ADN consta de ocho tipos de virus. Entre ellos, HHV-1 o HSV-1 y HHV-2 o HSV-2 son responsables de los herpes orofaciales-labiales y vaginales-anales.

Todos los virus del herpes comparten propiedades estructurales proteicas y genómicas, clínicas como latencia, recurrencia o activación lítica. Al igual que para todas las infecciones virales, los medios terapéuticos son complejos y a menudo limitados. La invención se compromete a resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéutica que ofrece la posibilidad de actuar contra una infección viral, en particular una infección viral que implica *Herpesviridae* y en particular HSV-1 y HSV-2.

Las infecciones con HSV-1 y HSV-2 son muy contagiosas (principalmente por contacto) y endémicas (Organización Mundial de la Salud (OMS), enero de 2016, "*Le virus de l'herpes*", memorándum No. 400, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/fr/#>). El reservorio es humano, sin zoonosis ni vectores. La prevalencia de las infecciones con HSV-1 responsables del herpes labial orofacial, de ciertas formas de herpes genital y de paroniquia herpética, es variable según los continentes, los métodos y las posibilidades de diagnóstico. Se estima que en promedio varía de 84 a 99% en África, de 50 a 100% en Asia, de 65 a 98% en Europa y de 57 a 68% en América del Norte. La prevalencia de infecciones por HSV-2, responsables del herpes genital y anal, es variable según el género, el perfil sociológico y étnico, la edad y el continente. Por ejemplo (de acuerdo con: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2010, MMW R Morb Mortal Wkly Rep., 59 (15): 456-459), la seroprevalencia en los Estados Unidos para el

intervalo de edad de 40 a 49 años se estima que es 32% en mujeres y 20% en hombres.

Al considerar la tasa de morbilidad, las infecciones por HSV-1 y HSV-2 tienen un cierto impacto en todo el mundo. De hecho, no existe un tratamiento curativo totalmente eficiente en términos de erradicaciones, ya sea que la administración de fármacos antivirales sea por vía oral o por vía parenteral, ya sea un análogo de pirofosfato (foscarnet, por ejemplo), análogos de nucleósidos no activables o activables *in situ* (como fiacitabina, vidarabina, aciclovir y su profármaco valaciclovir, por ejemplo) o de un inhibidor del complejo enzimático helicasa-primasa (pritelivir). Contribuyen a reducir la gravedad y la frecuencia de los síntomas, pero no erradican la infección. Muy a menudo, de acuerdo con la baja solubilidad de estas moléculas y en particular las de la familia «ciclovir» (1.3 mg/mL en agua a 25°C para aciclovir) así como de su absorción intestinal limitada (del orden del 20% para aciclovir oral), las dosis consiguientes deben administrarse a los pacientes.

A diferencia de los fármacos tópicos oftálmicos, las sustancias anti-HSV utilizadas en dermatología (como ciclofovir, ibacitabina, aciclovir, por ejemplo) tienen una eficacia clínica que sigue siendo modesta y no constante.

Además, las formas de resistencias adquiridas al virus de *Herpes simplex* a los tratamientos convencionales por vía oral o a través de una vía parenteral se describen en emergencia. A menudo están relacionadas con mutaciones del genoma viral (Bacon TH y col., 2003, Clin. Microbiol. Rev., 16(1), 114-128; Biswas S. y col., 2008, Antiviral Res., 80(1).), 81-85).

Además de las dimensiones de infectividad, dolor y un aspecto estético recurrente del paciente durante la reactivación viral, estas infecciones pueden complicarse por patologías graves y complejas, aunque siguen siendo muy raras, como la encefalitis herpética o la queratitis. La contaminación neonatal materna puede ser 60% mortal en ausencia de tratamiento. Las infecciones herpéticas y su desarrollo pueden asociarse con otras patologías, debido a la inmunodepresión (inducida o patológica) o a la inmunosupresión del paciente, como por ejemplo, en el caso de ciertos cánceres o después de un injerto. HSV-2 es parte de las infecciones más comunes (de 60 a 90%) entre las personas que portan el VIH. El riesgo de contraer una nueva infección por VIH se multiplica por tres en presencia de una infección por HSV-2. Los portadores de ambas infecciones tienen un mayor riesgo de transmitir el VIH.

Por lo tanto, el objeto de la invención es resolver el problema técnico que consiste en proporcionar un método para preparar dicha composición farmacéutica.

El objeto de la invención es también resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéuticamente activa que sea tópicamente aceptable.

El objeto de la invención es también resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéuticamente activa que sea fácilmente soluble en solventes hidrófilos.

El objeto de la invención es, además, resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéutica activa durante el paso trans-epidérmico.

El objeto de la invención es, además, resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéutica que se desactiva durante el paso transcutáneo.

El objetivo de la invención es, además, resolver el problema técnico que consiste en proporcionar

una composición farmacéutica, cuya fase biológica está bien delimitada y alcanzada.

El objeto de la invención es, además, resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéutica para la cual la biodisponibilidad es mínima.

El objeto de la invención es, además, resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéuticamente activa que tiene un efecto anti-replicación sobre un virus, y en particular sobre HSV.

El objeto de la invención es, además, resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéuticamente activa que tiene una alta citotoxicidad para células infectadas por un virus, y en particular por HSV.

El objeto de la invención es, además, resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéuticamente activa que tiene poca citotoxicidad para células sanas.

El objeto de la invención es, además, resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéuticamente activa que tiene una eficacia profiláctica y, en particular, para HSV.

El objetivo de la invención es, además, resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéuticamente activa que tiene una eficacia profiláctica, especialmente durante la fase prodrómica de la infección y, en particular, para el HSV.

El objeto de la invención es, además, resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéuticamente activa que tiene una eficacia profiláctica, en particular, acortando la fase aguda y, en particular, para el HSV.

El objeto de la invención es, además, resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéuticamente activa que puede prevenir o limitar el proceso infeccioso y, en particular, el de HSV.

El objeto de la invención es, además, resolver el problema técnico que consiste en proporcionar una composición farmacéuticamente activa que tiene buena estabilidad durante su conservación a temperatura ambiente y hasta 45°C.

Descripción de la invención

Los inventores han descubierto que era posible resolver los problemas técnicos mencionados anteriormente proporcionando una mezcla farmacéutica o terapéuticamente activa que comprende al menos un peroxometalato.

Por «farmacéuticamente activo» se entiende el hecho de que la mezcla o la composición tiene una actividad beneficiosa dentro del alcance de un tratamiento terapéutico.

El término «mezcla» se refiere a una composición y no se limita a la composición que designa un método particular de preparación o de fabricación. El término «mezcla» aquí ofrece la posibilidad de distinguir más fácilmente desde un punto de vista semántico la «mezcla» de la «composición» en particular cuando, por ejemplo, la «mezcla» está integrada en una «composición» que comprende otros ingredientes.

La invención se refiere más particularmente de acuerdo con un primer aspecto, a una composición o mezcla, preferiblemente terapéuticamente activa a través de una vía tópica, que comprende:

- al menos una sal metálica, seleccionándose el metal de molibdeno (Mo), wolframio (W), vanadio

(V), oro (Au), un lantánido, en particular lantano;

- al menos un agente quelante;
- al menos una fuente de radicales peroxidantes;
- al menos un agente tamponante.

5 La invención se refiere ventajosamente a una composición o mezcla, preferiblemente terapéuticamente activa por vía tópica, que comprende:

- al menos una sal metálica, eligiéndose el metal de molibdeno (Mo), wolframio (W), vanadio (V), oro (Au), un lantánido, en particular lantano;

- al menos un agente quelante;

10 - al menos una fuente de radicales peroxidantes;

- al menos un agente tamponante;

- dicha mezcla o composición preferiblemente tiene un potencial redox de 250 a 550 milivoltios, y preferiblemente de 300 a 450 milivoltios y de nuevo preferiblemente de 300 a 420 milivoltios.

15 La mezcla de acuerdo con la presente invención proporciona ventajosamente la posibilidad de formar un fármaco, y más particularmente un fármaco estable y activo *in situ*.

La mezcla de acuerdo con la presente invención consiste en un equilibrio de los compuestos mencionados anteriormente que forma ventajosamente un complejo peroxometálico que incluye sus sales. De acuerdo con los inventores, sin pretender imponer ninguna teoría, la mezcla de acuerdo con la presente invención da la posibilidad de formar una estructura supramolecular de tipo reticular en equilibrio estable
20 no permanente, lo que da la posibilidad de proporcionar a nivel extracelular e *in situ* un catalizador para las reacciones similares a la de Fenton y Haber-Weiss. Se dice que estas reacciones son "similares" cuando tienen lugar debido al metal de la mezcla de la invención o de otro metal que no sea hierro. Una parte de las sustancias reactivas generadas extra temporalmente por la sustancia activa penetra en la célula, y más ventajosamente en la célula infectada.

25 De acuerdo con una variante, la composición incluye varias sales metálicas, seleccionándose el metal de molibdeno (Mo), wolframio (W), vanadio (V), oro (Au), un lantánido, en particular lantano.

De acuerdo con una modalidad, la sal metálica es una sal de molibdeno o que contiene molibdeno.

De acuerdo con una modalidad, la sal metálica es una sal de lantánido o que contiene lantánido.

30 De acuerdo con una modalidad, la sal metálica es una mezcla de sal de molibdeno y sal de lantánido.

La invención se refiere ventajosamente a una composición o mezcla, preferiblemente terapéuticamente activa por vía tópica, que comprende:

- al menos una sal de molibdeno (Mo), opcionalmente en combinación con al menos una sal de un metal seleccionado de tungsteno (W), vanadio (V), oro (Au), un lantánido, en particular lantano;

35 - al menos un agente quelante;

- al menos una fuente de radicales peroxidantes;

- al menos un agente tamponante;

- dicha mezcla o composición preferiblemente tiene un potencial redox de 250 a 550 milivoltios, y

preferiblemente de 300 a 450 milivoltios y de nuevo preferiblemente de 300 a 420 milivoltios.

Preferiblemente, la sal metálica está presente como óxido(s) o peróxido(s) en la mezcla. Ventajosamente, los óxidos metálicos de la mezcla de la invención permiten formar un producto intermedio que es un ácido metálico, y más particularmente un ácido de Lewis.

5 De acuerdo con una variante, se prefiere un compuesto metálico para el cual el estado de oxidación del metal es compatible con la reacción de Fenton-Haber-Weiss y “similar” a la reacción de Fenton-Haber-Weiss (una reacción de oxidación-reducción que implica otros iones metálicos tales como hierro, que, en nuestro caso, se encuentra en un contexto de quelación) metaestable, es decir, principalmente metales de transición y en particular Mo (VI), W (IV) a (VI), V (III) a (V), Au (I) a (III).

10 De acuerdo con una variante, se prefiere un compuesto lantánido que puede formar un sesquióxido del tipo LnO_3 , para el cual el estado de oxidación es compatible con la reacción Fenton-Haber-Weiss y “similar” a la de Fenton-Haber-Weiss y particularmente La(III), Ce (III) y (IV), Nd (III) y (IV), Sm (III) y (IV), Gd (IV).

Ventajosamente, el metal de metalato o del lantano tiene una valencia máxima.

15 Ventajosamente, el metal o el lantánido se oxidan a su grado máximo de oxidación.

De acuerdo con una variante preferida, la sal metálica comprende molibdeno. Por lo tanto, de acuerdo con una variante, la sal metálica es una sal de molibdeno. Más específicamente, la mezcla de acuerdo con la presente invención preferiblemente comprende molibdato de sodio. De acuerdo con la invención, se prefiere el uso de una sal de molibdeno, en la que la valencia del molibdeno es de grado VI.

20 Esta sal proporciona ventajosamente la posibilidad de proporcionar estabilidad significativa a la mezcla de la composición. Además, el molibdeno, especialmente como una sal y, por ejemplo, como una sal de sodio, con su valencia reactiva (VI), su electronegatividad compatible, su citotoxicidad muy baja, su posibilidad de reacción Fenton-Haber-Weiss que puede ser «similar», es particularmente preferido.

De acuerdo con una variante, la sal metálica formada comprende un peroxometalato, y más particularmente que se puede encontrar en forma intermedia de hidroperoxometalato.

Ventajosamente, la sal de molibdeno está preferiblemente con una unidad peroxo o hidro-peroxo. Todavía ventajosamente, la sustancia activa es del tipo MoO_4^{2-} o su forma hidro-peroxo (ver Oyerinde Oyeyemi F. y col., *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). Por ejemplo, se puede encontrar un complejo intermedio de fórmula del tipo $\text{Na}_4[\text{Mo}_2\text{O}_6(\text{quelante})]\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ en la mezcla de la invención.

De acuerdo con una variante, el metal y su sal es un lantánido o su sal.

De acuerdo con una variante, la sal metálica formada comprende un peroxolantanato, y más particularmente que se puede encontrar de nuevo en forma de un intermedio hidro- peroxolantanato. Por ejemplo, puede encontrarse como un complejo intermedio de una fórmula del tipo $\text{NaLn}(\text{quelante})\cdot x\text{H}_2\text{O}_2\cdot y\text{H}_2\text{O}$ (con x e y que depende del tipo de lantánido (Ln) usado en la mezcla de la invención).

Ventajosamente, la sal de molibdeno y lantánido, y más particularmente lantano, es preferiblemente

de unidad peroxo o hidro-peroxo (ver Suponitskiy, YL, Proshina, OP, Dyunin, AG y col., *Thermodynamic properties of lanthanum Molybdates*, Russ. J. Phys. Chem. 2016) 90:267. Doi:10.1134/S00360244160202031X).

Ventajosamente, el uso de una sal de molibdeno proporciona la posibilidad de limitar la citotoxicidad de la mezcla de acuerdo con la invención, en particular sobre corpúsculos rojos y linfocitos, epitelios, fibroblastos, osteoblastos.

Una ventaja del uso de molibdeno radica en su presencia natural como cofactores enzimáticos (como por ejemplo xantina oxidasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa con ferredoxina, etc.).

Ventajosamente, el uso de una sal de lantano proporciona la posibilidad de limitar la citotoxicidad de la mezcla de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una variante preferida, el metal en forma de su sustancia activa desempeña un papel de catalizador para la producción de sustancias reactivas $\text{HO}_2^{\cdot}$, y opcionalmente $\text{HO}^{\cdot}$ y $\text{O}_2^{\cdot}$.

De acuerdo con una variante, la mezcla de acuerdo con la invención comprende de 0.1 a 500 μM , y preferiblemente de 1 a 200 μM , y aun más preferiblemente de 5 a 150 μM de sal metálica.

De acuerdo con una variante, la mezcla de acuerdo con la invención comprende de 0.1 a 100 μM , y preferiblemente de 1 a 50 μM , y más preferiblemente de 5 a 30 μM de sal metálica de molibdeno.

De acuerdo con una variante, la mezcla de acuerdo con la invención comprende de 0.1 a 100 μM , y preferiblemente de 1 a 50 μM , y más preferiblemente de 5 a 30 μM de sal metálica de lantano.

Los términos de “agentes quelantes” (o “quelantes”) corresponden a compuestos químicos capaces de formar un complejo de coordinación estable con uno o varios iones y más particularmente con las formas iónicas del metal presente en la composición. El metal puede estar presente en cualquier forma, incluso en una forma peroxidada o hidroperoxidada. Se dice que este complejo es un «quelato».

Los agentes quelantes que pueden ser adecuados para la mezcla de acuerdo con la presente invención catalizarán ventajosamente por vía extracelular, por una parte la producción *in situ* de radicales reactivos $\text{HO}_2^{\cdot}$; principalmente pero también $\text{O}_2^{\cdot}$ y $\text{OH}^{\cdot}$ y permiten, por otra parte, la quelación de los iones de calcio y de metal incluyendo iones ferrosos (Fe(II) o Fe^{2+}) e iones férricos (Fe(III) o Fe^{3+}) que son extracelulares, unidos o libres. La liberación de estos reactivos es aun más eficiente ya que la afinidad de los quelatos por los iones Ca^{2+} y $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ extracelulares es significativa. Estos quelatos son compuestos estables presentes en la mezcla farmacéuticamente activa de la invención y participan además de la producción preferencial del radical $\text{HO}_2^{\cdot}$, en la actividad farmacéutica o terapéutica de la mezcla de acuerdo con la presente invención, especialmente mediante quelación preferencial *in situ* de los iones de calcio y hierro. Esta quelación *in situ* también permitiría la regulación a un nivel extracelular de los influjos de calcio de las células, en particular inducido por infección viral, por un lado, como por ejemplo por *Herpesviridae*, y por el estrés oxidativo debido a la presencia de radicales o compuestos peroxo, por otro lado.

Ventajosamente, los agentes quelantes no penetran en la célula y permanecen extracelulares.

De acuerdo con una variante preferida, los agentes quelantes estabilizaron los complejos peroxo e hidro-peroxomolibdato contenidos en la formulación. Tales peroxo- e hidro-peroxomolibdatos pueden ser del tipo $(\text{Mo}_2\text{O}_6)^{4+}$ y $[\text{Mo}_4\text{O}_{12}(\text{O}_2)_2]^{4+}$.

Ventajosamente, de acuerdo con una variante, el agente quelante permite la estabilización por quelación del ion de sustancia activa MoO_4^{2-} , que en su forma de sodio tiene un peso molecular de 205.937 g por mol o peroxomolibdato (por ejemplo en forma de $\text{MoO}_3\text{-BAPTAH}_2^{2-}$) y/o $\text{MoO}_3\text{-EGTAH}_2^{2-}$).

De acuerdo con una variante, la mezcla de acuerdo con la invención comprende al menos dos
5 agentes quelantes.

Ventajosamente, el o los agentes quelantes se unen por coordinación del metalato oxidado o peroxidado en solución.

De acuerdo con una variante, el agente quelante forma un complejo con el metalato oxidado o peroxidado con el fin de formar un complejo dimérico intermedio $[\text{Mo}_2\text{O}_6(\text{quelante})]^{4+} \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ y/o la forma
10 de peroxotetramolibdato (VI) $[\text{Mo}_4\text{O}_{12}(\text{O}_2)_2]^{4+}$ -quelante, cuando la sal metálica es una sal de molibdeno.

De acuerdo con una variante, el agente quelante forma un complejo con el metalato oxidado o peroxidado con el fin de formar un complejo $[\text{W}_2\text{O}_6(\text{quelante})]^{4+} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, cuando la sal metálica es una sal de tungsteno.

De acuerdo con una variante, el agente quelante forma un complejo con un lantánido oxidado o
15 peroxidado con el fin de formar notablemente un complejo $[\text{La}(\text{O}_2)\text{-quelante}]^{2+} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, cuando la sal de lantánido es una sal de lantano.

Ventajosamente, el agente quelante es compatible con la captura estérica de los complejos oxidados y/o peroxidados del metalato. Más particularmente, el tamaño de su "bolsillo" N---N que separa los residuos carboxílicos implicados en la coordinación, así como el plegamiento estérico de la cadena carbonosa de este bolsillo que debería ser ventajosamente compatible con la captura de complejos
20 metálicos intermedios, notablemente en una forma oxidada y/o peroxidada. Ventajosamente, el agente quelante es compatible con las cargas electrónicas del metalato y con su estructura orbital atómica externa.

De acuerdo con un aspecto, los agentes quelantes se seleccionan de poliácidos orgánicos y sales de los mismos, especialmente poliácidos aminocarboxílicos. Típicamente, los poliácidos aminocarboxílicos comprenden uno o más átomos de nitrógeno de una función amina, preferiblemente una amina secundaria o terciaria unida a al menos dos grupos de ácidos carboxílicos, a través de átomos, generalmente carbono y opcionalmente átomos de oxígeno.
25

De acuerdo con una variante, el o los agentes quelantes presenten, por ejemplo, tienen al menos tres grupos de coordinación, preferiblemente grupos de ácidos carboxílicos, en tres extremos de la a las
30 moléculas que forman el o los agentes quelantes, estando dichos grupos de coordinación separados por una cadena de al menos tres átomos que incluyen al menos un átomo de nitrógeno.

Ventajosamente, el o los agentes quelantes tienen cinco grupos de coordinación, preferiblemente grupos de ácidos carboxílicos, en cinco extremos de la o las moléculas que forman el o los agentes quelantes, estando dichos grupos de coordinación separados por una cadena de al menos seis átomos y
35 preferiblemente nueve átomos, incluyendo un átomo de nitrógeno y preferiblemente dos átomos de nitrógeno separados por al menos dos átomos.

De acuerdo con una variante, el o los agentes quelantes tienen cuatro grupos de coordinación, preferiblemente grupos de ácidos carboxílicos, en cuatro extremos de la o las moléculas que forman el o

los agentes quelantes, estando dichos grupos de coordinación separados por una cadena de al menos seis átomos y preferiblemente doce átomos, incluidos dos átomos de nitrógeno separados por al menos ocho átomos.

De acuerdo con una variante, los átomos que separan dichos grupos de coordinación y/o los átomos de nitrógeno del o de los agentes quelantes se seleccionan de átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno. Algunos de los átomos que separan dichos grupos de coordinación y/o los átomos de nitrógeno del o de los agentes quelantes pueden incluirse en uno o varios anillos atómicos idénticos o diferentes, tales como por ejemplo anillos no aromáticos, aromáticos o heteroaromáticos, por ejemplo un fenilo o un piridilo.

Ventajosamente, el agente quelante se selecciona de BAPTA (ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-*N,N,N',N'*-tetraacético), EGTA: (ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético), DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) y cualquiera de sus mezclas.

De acuerdo con una variante, el agente quelante se selecciona de BAPTA, EGTA y cualquiera de sus mezclas.

Ventajosamente, BAPTA y/o EGTA permiten una mejor estabilidad de los precursores así como un mejor rendimiento de síntesis.

Los pKas de los 4 grupos carboxílicos de BAPTA son: pK1 y pK2 <4 (BAPTA insoluble), pK3 = 5.47 y pK4 = 6.36; y de EGTA son: pK1 = 2.00, pK2 = 2.65, pK3 = 8.85 y pK4 = 9.46.

Ventajosamente, los pKas del o de los agentes quelantes son compatibles con el pH de la solución de la invención.

Ventajosamente, los pKas del o de los agentes quelantes son compatibles con el pKa del ácido metálico o perácido metálico formado de manera intermedia en la solución de la invención.

Ventajosamente, los pKas del o de los agentes quelantes son compatibles con el pH de la región infectada, tal como, por ejemplo, el epitelio.

Ventajosamente, los agentes quelantes seleccionados son ligeramente citotóxicos. Este es especialmente el caso de BAPTA y EGTA.

La sal metálica y los agentes quelantes están presentes en una cantidad y proporción suficientes para la producción de complejos {agentes peroxo-metalato-quelantes}.

Preferiblemente, al menos uno de los agentes quelantes presentes tiene una mayor afinidad por el calcio que por el metal usado en la mezcla de la invención. Esto proporciona ventajosamente la posibilidad de sustitución de los complejos de quelato de la mezcla de la invención con un complejo de agente quelante-calcio *in vivo*. Ventajosamente, la concentración del o de los quelatos es compatible con la concentración de Ca^{2+} extracelular (2-3 mM en un plasma humano), es decir, el o los agentes quelantes presentes en la mezcla de la invención están en cantidades suficientes para formar eficientemente un complejo desde un punto de vista terapéutico con la cantidad presente de calcio extracelular.

Ventajosamente, los quelatos presentes tienen una afinidad mayor por el hierro ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) que por el metal usado en la mezcla de la invención. Esto permite ventajosamente la sustitución de los complejos de quelato de la mezcla de la invención con un agente quelante-complejo $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, *in vivo*.

De acuerdo con una variante, la mezcla de acuerdo con la invención comprende de 0.0001 a 1 mM de agentes quelantes.

De acuerdo con una variante, la mezcla de acuerdo con la invención comprende de 0.1 a 100 μM , y preferiblemente de 1 a 50 μM , y aun más preferiblemente de 5 a 20 μM de BAPTA. De acuerdo con una variante, la mezcla de acuerdo con la invención incluye de 1 a 80 μM , y preferiblemente de 20 a 80 μM de BAPTA.

De acuerdo con otra variante, la mezcla de la invención comprende de 0.1 a 1 mM, y preferiblemente de 50 a 800 μM , y aún más preferiblemente de 200 a 700 μM de EGTA. De acuerdo con una variante, la mezcla de la invención incluye de 200 a 2,000 μM , y preferiblemente de 600 a 1,400 μM de EGTA.

De acuerdo con otra variante, la mezcla de la invención comprende BAPTA y EGTA presentes en una concentración de 0.0001 a 1 mM, y preferiblemente de 5 a 20 μM y de 200 a 700 μM , respectivamente.

De acuerdo con una variante, la sal de molibdeno y los agentes quelantes están presentes de acuerdo con una proporción de 10/1 a 1/100 (proporción: sal de Mo/agente quelante, expresada en concentraciones molares).

De acuerdo con una variante, la sal de lantano y los agentes quelantes están presentes de acuerdo con una proporción de 10/1 a 1/100 (relación: sal de La/agente quelante, expresada en concentraciones molares).

Según una variante, la sal de molibdeno y BAPTA están presentes de acuerdo con una proporción de 3/1 a 1/10, expresada en concentraciones molares.

De acuerdo con una variante, la sal de molibdeno y EGTA están presentes de acuerdo con una proporción de 1/10 a 1/70, expresada en concentraciones molares.

De acuerdo con una variante, la sal de lantano y BAPTA están presentes de acuerdo con una proporción de 3/1 a 1/10, expresada en concentraciones molares.

De acuerdo con una variante, la sal de lantano y EGTA están presentes de acuerdo con una proporción de 1/10 a 1/70, expresada en concentraciones molares.

De acuerdo con una variante, la fuente de radicales es principalmente H_2O_2 .

De acuerdo con una variante, una o varias fuentes secundarias de radicales pueden agregarse o sintetizarse en minoría *in situ*.

De acuerdo con una variante, H_2O_2 es una solución acuosa que comprende H_2O_2 a 110 volúmenes o 30% o 8.82 M.

Ventajosamente, la fuente de H_2O_2 no comprende ningún agente estabilizador seleccionado de: ácidos piridinocarboxílicos, tales como, por ejemplo, ácido picolínico; ácidos fosfónicos y aminofosfónicos; amidas o aminas sustituidas; ácidos alquilsulfónicos; y mezclas de los mismos.

De acuerdo con una variante, la fuente principal de radicales peroxidados es el peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, de acuerdo con esta variante, el peróxido de hidrógeno está presente en una concentración que varía de 200 a 600 mM, preferiblemente de 300 a 500 mM, y aun más preferiblemente de 340 a 450 mM.

De acuerdo con una variante, la mezcla de acuerdo con la invención comprende una proporción de peróxido de hidrógeno que varía de 30 mM a 4.4 M, y preferiblemente de 150 mM a 3 M, y preferiblemente de 235 mM a 1.8 M, y aun más preferiblemente de 260 mM a 440 mM. De acuerdo con una variante, la mezcla de la invención no comprende ninguna adición extemporánea de perácido.

5 Ventajosamente, la cantidad (o la concentración) de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se ensaya por valoración. Típicamente, es posible usar un ensayo por medio de una solución de permanganato de potasio.

La concentración de peróxido de hidrógeno también se puede analizar mediante espectroscopía UV.

10 Ventajosamente, se usa un agente tamponante para controlar específicamente el pH de la mezcla de acuerdo con la invención.

Ventajosamente, se usa un agente tamponante para controlar específicamente el pH durante la aplicación *in situ* de la solución de acuerdo con la invención.

De los agentes tamponantes, se prefiere un ácido carboxílico.

15 Preferiblemente, el agente tamponante no comprende los siguientes ácidos: ácidos carboxílicos hidroxilados (por ejemplo, ácido málico) o ácidos policarboxílicos (por ejemplo, ácidos cítrico e isocítrico, ácido malónico); los ácidos carboxílicos de un peso molecular superior a 100 g/mol y en particular ácidos carboxílicos de cadena larga (mayor a C6) debido a las desestabilizaciones de la membrana celular que pueden inducir, así como ácidos carboxílicos alifáticos insaturados (ácido sórbico, por ejemplo) por su
20 posibilidad de peroxidación del tipo alquenoico que es citotóxica.

De acuerdo con una variante, la presente invención incluye la presencia de ciertos ácidos generados *in situ* durante la síntesis, preferiblemente en una pequeña cantidad (tal como, por ejemplo, ácido peracético). Se usan como una fuente accesoria de radicales después de la fabricación de la invención y el uso terapéutico de la invención.

25 De acuerdo con una variante, un agente tampón que tiene un pKa al nivel de pH fisiológico (piel y mucosas), es decir, un pH por ejemplo comprendido entre 4.4 y 5.0 y compatible con el pKa del ácido metálico oxidado y/o peroxidado, cuya forma es ionizada (por ejemplo, MoO_4H_2 , $\text{pK}_1 = 3.61$ y $\text{pK}_2 = 3.89$).

Preferiblemente, el agente tamponante está presente en la mezcla de la invención en una concentración comprendida entre 1 y 500 mM, y preferiblemente entre 10 y 200 mM, aun más
30 preferiblemente entre 50 y 100 mM.

La proporción de las concentraciones molares de peróxido de hidrógeno y de agente tamponante está comprendida entre 2 y 9 y preferentemente entre 3 y 8.

Ventajosamente, la mezcla se tampona para obtener un pH de 4.4 a 5.0 que es compatible i) para un contacto de la invención con la piel y las membranas mucosas, ii) la estabilidad de la sustancia activa
35 MoO_4^{2-} en presencia de H_2O_2 , iii) la reacción catalítica “similar” a la de Fenton-Haber-Weiss o no, y, iv) la producción *in situ* de especies radicales principalmente del tipo $\text{HOO}^\cdot$.

De acuerdo con una variante, la mezcla comprende como agente tamponante que permite un pH de 4.0 a 5.2, preferentemente de 4.4 a 5.0, por ejemplo un ácido carboxílico, y preferentemente ácido

acético.

Ventajosamente, la mezcla tiene un potencial redox de 350 a 450 mV, y preferiblemente de 350 a 420 mV.

La eficacia de redox de la mezcla de la invención también se puede estimar por oxidación *in vitro* de quercetina mediante iones de hierro (III) o de Fe^{3+} . Para esto se puede utilizar particularmente un método de ensayo llamado "método de quercetina" (adaptado, por ejemplo, de estudios de El Hajji H. y col. (2006) "*Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation*", Free Radic. Res., 40(3), 303-320 y Balcerzak M. y col. (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).

La presente invención también se refiere a un método para preparar una mezcla tal como se define de acuerdo con la presente invención. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para preparar una mezcla de acuerdo con la invención que comprende (i) la preparación de una solución tampón (ST) que comprende un agente tamponante que tiene un pH ácido, (ii) la preparación de una solución de un complejo metálico (SC) que comprende una sal de óxido metálico, (iii) la preparación de una primera solución inicial (Si1) que comprende peróxido de hidrógeno, (iv) la preparación de una segunda solución inicial (Si2) mezclando la solución ST con la solución Si1, (v) la preparación de una solución (S1) que comprende un compuesto de peroxo-metal mezclando la solución SC con la solución Si2, (vi) la preparación de una solución S2 ajustando el pH de la solución S1 con una base, el pH de la solución S2 es más básico que el pH de la solución ST, (vii) la adición a la solución S2 de uno o varios agentes quelantes, (viii) ajuste opcional del pH, (ix) ajuste opcional del volumen de la solución final, la obtención de una mezcla farmacéutica activa según se define de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una variante, cuando se usan dos o más sales de óxido metálico, con diferentes óxidos metálicos, la preparación de una solución de un complejo metálico (SC) puede consistir en la preparación de soluciones separadas para cada sal de óxido metálico y luego mezclar estas soluciones simultánea o sucesivamente con la solución Si2 para preparar una solución S1.

Preferiblemente, la preparación de la mezcla de acuerdo con la presente invención se logra de acuerdo con un método de síntesis catalítica. La síntesis catalítica de la mezcla de acuerdo con la invención es típicamente secuencial. Ventajosamente, el método de la invención comprende la secuencia de las etapas (iii) => (iv) => (v) => (vi) => (vii) => (viii) => (ix).

Ventajosamente, el método de preparación comprende un seguimiento por análisis espectral (por ejemplo, mediante análisis de los espectros IR, UV y/o visible) en una o varias etapas de preparación, y preferiblemente durante todas las etapas de preparación.

De acuerdo con una variante, la primera solución inicial Si1 tiene un primer potencial redox mayor que el potencial redox de la mezcla de acuerdo con la invención.

Preferiblemente, posteriormente a la etapa (ix), no hay dilución del volumen de la mezcla para evitar desplazamientos de los equilibrios químicos de la mezcla de acuerdo con la presente invención.

Por supuesto, es ventajoso usar sustancias o compuestos con pureza suficientemente satisfactoria como materias primas. En particular, es necesario que las diferentes sustancias o compuestos tengan

compatibilidad con el uso terapéutico.

De acuerdo con una variante, es posible realizar espectrometría IR-FT, RMN-H y/o de masas en la mezcla producida de acuerdo con la invención con el fin de estar seguros del cumplimiento de la composición de la mezcla con los requisitos industriales, y en particular para uso terapéutico farmacéutico.

- 5 Asimismo preferiblemente se lleva a cabo una espectrometría IR-FT sobre los componentes precursores de la mezcla de la invención.

De acuerdo con una variante, el pH puede controlarse en una o varias, o incluso en todas las etapas de preparación.

- 10 De acuerdo con una variante, el potencial redox se puede controlar en una o varias, o incluso en todas las etapas de preparación.

De acuerdo con una variante, la mezcla de la invención se puede controlar mediante densimetría y/o espectrofotometría UV, en una o varias, o incluso en todas las etapas de preparación.

- 15 De acuerdo con una variante, es posible ensayar la eficacia de redox de la mezcla de la invención por medio del método de quercetina (ensayo espectrofotométrico UV de la oxidación *in vitro* de quercetina por el Fe^{3+} presente o producido *in vitro*).

Ventajosamente, el peróxido de hidrógeno está presente en la solución Si1 en una concentración que varía de 200 a 600 mM, preferiblemente de 300 a 500 mM, y aun más preferiblemente de 330 a 460 mM.

- 20 De acuerdo con una modalidad, el material usado es metálico y preferiblemente es de acero inoxidable, opcionalmente pasivado.

De acuerdo con una modalidad, el material puede ser re-pasivado después de preparar de antemano la mezcla de la invención, por ejemplo, colocando el material (que estará en contacto con la mezcla o sus precursores) en contacto con una solución de peróxido de hidrógeno.

- 25 Es preferible llevar a cabo un ensayo de la fuente de peróxido de hidrógeno para asegurar la cantidad de peróxido de hidrógeno presente y hacerlo partícipe en la preparación de la mezcla de la invención. Este ensayo puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante valoración o mediante espectrofotometría UV (generalmente a 240 nm).

Ventajosamente, el pH de la solución tampón ST es de 4.4 a 5.0, y preferiblemente de 4.7 a 4.8.

- 30 Ventajosamente, el agente tamponante de la solución ST es un tampón de ácido carboxílico/carboxilato, y la solución ST tiene una proporción de peróxido de hidrógeno/carboxilato comprendida entre 20/1 y 1/1, y preferiblemente de aproximadamente 5/1.

- 35 Ventajosamente, la proporción de ácido acético (AcOH) con su sal de acetato añadida en una cantidad limitante, permite la producción más baja de ácido peracético (AcOOH). Ventajosamente, en un método de preparación de acuerdo con la invención, la producción de ácido peracético es mínima y la influencia catalítica de la misma es muy pequeña.

La preparación de la primera solución inicial Si1 comprende la preparación de una solución acuosa de ácido carboxílico, y preferiblemente de ácido acético y luego la adición de peróxido de hidrógeno.

Preferiblemente, la primera solución inicial Si1 tiene un pH de 2.5 a 4.6, y preferiblemente de 2.7 a

4.2. Ventajosamente, la primera solución inicial Si1 tiene un potencial redox de 400 a 550 mV, y preferiblemente de 420 a 500 mV.

Ventajosamente, el método comprende una medición del potencial redox en las etapas (iii) a (ix), y preferiblemente también comprende una medición del pH en las etapas (iii) a (ix).

5 De acuerdo con una variante, la segunda solución inicial Si2 tiene un pH de 2.5 a 3.2, y preferiblemente de aproximadamente 2.9. De acuerdo con una variante, la solución inicial Si2 tiene un potencial redox mayor que el potencial redox de la primera solución inicial Si1. El potencial redox de la segunda solución inicial Si2 puede ser de 420 a 570 mV, y preferiblemente de 440 a 520 mV.

De acuerdo con una variante, la solución tampón ST se introduce en la primera solución inicial Si1.

10 De acuerdo con una modalidad, la concentración de peróxido de hidrógeno en la segunda solución inicial Si2 varía de 300 a 500 mM, y preferiblemente de 260 a 440 mM.

Ventajosamente, en la etapa (iv), el pH se mantiene inferior al límite de pH admisible para la reacción catalítica de síntesis para la mezcla de acuerdo con la invención. Se usa ventajosamente un agente tamponante en la etapa (iv).

15 Ventajosamente, en la etapa (iv), la producción generada *in situ* de ácido peracético es mínima.

Ventajosamente, en la etapa (iv) el potencial redox de la solución Si1 de la etapa (iii) aumenta, por ejemplo pasando de un valor de 440 a 460 mV a un valor de 460 a 480 mV de la etapa (iv).

Al rastrear la concentración de peróxido de hidrógeno presente durante la preparación de la mezcla de la invención, se observa producción de peróxido durante su introducción, es decir, la puesta en contacto del peróxido de hidrógeno con la solución tampón (etapa (iv)). Ventajosamente, la adición de peróxido de hidrógeno se lleva a cabo en una solución acuosa tamponada previamente a un pH ácido. Por lo tanto, para la preparación de la primera solución inicial Si1, se agrega peróxido de hidrógeno en una solución con un pH ácido, y por ejemplo con un pH de 2.7 a 4.2.

25 Ventajosamente, la etapa (iv) conduce al desplazamiento del equilibrio hacia una producción *in situ* de H₂O₂ con destrucción del ácido peracético generado posiblemente por los equilibrios químicos.

De acuerdo con una variante, la solución tampón SC se introduce en la solución S1.

De acuerdo con una variante, la solución S1 que comprende un complejo peroxometálico tiene un pH de 2.5 a 3.5, y preferiblemente de 2.8 a 3.0.

30 De acuerdo con una modalidad, el potencial redox de la solución S1 que comprende un complejo peroxometálico varía de 400 a 550 mV, y preferiblemente de 440 a 500 mV.

De acuerdo con una modalidad, la concentración de peróxido de hidrógeno en la solución S1 que comprende un complejo peroxometálico varía de 250 a 500 mM, y preferiblemente de 320 a 450 mM.

En la etapa (v), la sal de molibdato añadida está en forma de ácido molibídico MoO₃.H₂O y MoO₃.2H₂O.

35 En condiciones no inventivas, la síntesis en el equilibrio de la sustancia activa MoO₄²⁻, a temperatura ambiente, sin catalizador y sin añadir ácido fuerte (H₂SO₄, por ejemplo) requeriría varios días.

De acuerdo con una modalidad, el pH de la solución S2 se tampona a un valor preferiblemente comprendido entre 4.4 y 5.0, y por ejemplo de 4.5 a 5.0. Ventajosamente, a este pH tamponado, es la forma

inestable MoO_4^{2-} que predomina (estado de oxidación Mo(VI)) y el peróxido de hidrógeno se estabiliza. El peróxido de hidrógeno a menudo se estabiliza industrialmente mediante un tampón de fosfato. Puede formarse un compuesto intermedio inestable de fosfomolibdato (amarillo) que desaparece en el equilibrio, haciendo que el H_2O_2 sea más reactivo.

5 De acuerdo con una variante, el potencial redox de la solución S2 varía de 300 a 450 mV, y preferiblemente de 360 a 410mV.

Los óxidos de molibdeno Mo(VI) en una solución acuosa y al pH de síntesis de la mezcla de la invención pueden existir bajo diferentes estructuras moleculares: MoO_4^{2-} y $[\text{MoO}_6^{2-}]$, $[\text{Mo}_2\text{O}_3(\text{O}_2)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{2-}$, pero también en formas polinucleares reactivas (tales como estructuras complejas binucleares oxo-Mo(VI)
10 (Dement'ev I.A. y col. (2007) "*Mononuclear, polinuclear, and cluster complexes of molybdenum and their reactions as models of biochemical systems and processes*", *Russ. J. Gen. Chem.*, 77(5), 822-843)).

Ventajosamente, las condiciones de preparación permiten la formación *in situ* de peroxo- e hidro-peroxomolibdato cuando la sal metálica utilizada es una sal de molibdeno. Los últimos son del tipo: $[\text{Mo}_2\text{O}_3(\text{O}_2)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{2-}$. De acuerdo con una variante, se prefiere un exceso molar de peróxido de hidrógeno
15 superior a 1000 veces, y de sal metálica, y en particular superior a 10,000 veces, y aun más preferiblemente 15,000 veces, con respecto a Mo(VI).

Ventajosamente, el o los agentes quelantes, así como el pH de síntesis limitan los desplazamientos de la reacción del tipo "reductor de Jones" que consisten en la reducción del ion metalato, ventajosamente, molibdato, a un estado de oxidación baja correspondiente al metal molibdeno. De acuerdo con una variante,
20 este desplazamiento está limitado en un medio acuoso ligeramente ácido, típicamente con un pH comprendido entre 4.4 y 5.0, y por ejemplo entre 4.5 y 4.7.

Preferiblemente, cuando están presentes varios agentes quelantes, se preparan soluciones independientes de agentes quelantes, cada solución comprende un agente quelante específico.

De acuerdo con una variante preferida, la adición de los agentes quelantes se logra con un orden
25 de aumento de pKa.

Por ejemplo, es posible preparar, por un lado, una solución que comprenda un agente quelante del tipo BAPTA y, por otro lado, una solución de agente quelante del tipo EGTA. Preferiblemente se agrega BAPTA y luego EGTA.

Ventajosamente, el o los agentes quelantes permiten, *in situ*, es decir, después de la aplicación
30 tópica, en particular, la reacción de Fenton-Haber-Weiss con una constante de disociación $K_{d\text{quelato}}$: $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} > \text{Ca}^{2+}$.

Ventajosamente, el o los agentes quelantes permiten extracelularmente la auto-sustentación *in situ* de la producción de radical reactivo $\text{HOO}^{\bullet}$ principalmente y en minoría $\text{O}_2^{\bullet}$ y $\text{HO}^{\bullet}$.

De acuerdo con una variante, es posible primero agregar BAPTA a la solución S2 para obtener una
35 solución S3 resultante. La solución S3, por ejemplo, tiene un pH que varía de 4.0 a 5.0, y preferiblemente de 4.3 a 4.8. La solución S3, por ejemplo, tiene un potencial redox esencialmente idéntico al de la solución S2. En otras palabras, el potencial redox no varía al agregar el agente quelante del tipo BAPTA. De acuerdo con una variante, el potencial redox de la solución S3 varía de 250 a 450 mV, y preferiblemente de 300 a

400 mV. Ventajosamente, se consigue la disolución preliminar de BAPTA en un pequeño volumen de solución S2 antes de ponerla en contacto con el resto de la solución S2.

Preferiblemente, la concentración de BAPTA está en una proporción molar de 1/1 a 1/3 y preferiblemente 1/2, con respecto a la sal de molibdeno.

5 Por ejemplo, la solución S3 tiene una concentración de peróxido de hidrógeno de 250 a 500 mM, y preferiblemente de 320 a 440 mM.

Ventajosamente, es posible añadir al menos otro agente quelante del tipo EGTA en la solución S3 para obtener una solución S4 resultante. De acuerdo con una variante, la solución S4 tiene un pH que varía de 4.0 a 5.0, y preferiblemente de 4.3 a 4.7. De acuerdo con una variante, el potencial redox de la solución
10 varía de 300 a 400 mV, y preferiblemente de 350 a 390 mV.

Preferiblemente, la concentración de EGTA está en una proporción molar de 10/1 a 50/1 y preferiblemente de aproximadamente 25/1, con respecto a la sal de molibdeno.

Por ejemplo, la solución S4 tiene una concentración de peróxido de hidrógeno de 250 a 550 mM, y preferiblemente de 320 a 470 mM.

15 De acuerdo con una variante, el pH en la etapa (viii) se ajusta mediante una solución básica, por ejemplo, del tipo hidróxido de sodio, preferiblemente concentrado, por ejemplo, en una concentración de 8 a 15 M. Ventajosamente, el pH en la etapa (viii) puede ajustarse a un valor de 4.4 a 5.0, y preferiblemente de aproximadamente 4.6.

De acuerdo con una variante, el pH de la mezcla de la invención varía de 4.50 a 4.70.
20 Ventajosamente, el potencial redox de la mezcla de la invención varía de 320 a 390 mV.

De acuerdo con una variante preferida, el método comprende una disminución en el potencial redox en la etapa (vi). Una disminución del potencial redox puede ser, por ejemplo, de 50 a 150 mV, y típicamente puede ser de aproximadamente 90 mV.

Preferiblemente, el potencial redox es sustancialmente constante después de la disminución del
25 potencial redox de la etapa (vi).

Ventajosamente, la mezcla de acuerdo con la presente invención es estable con el tiempo durante el almacenamiento, por ejemplo a temperatura ambiente o hasta una temperatura de 45°C durante seis meses. Se recomienda mantener la mezcla en la oscuridad y lejos de la humedad.

El pH se mide mediante un medidor de pH calibrado y una temperatura compensada, con un
30 electrodo combinado de KCl 4M/AgCl.

El potencial redox se mide con un medidor de pH/redox combinado, equipado con un electrodo calibrado de platino/calomelano. Típicamente, esta medición se realiza a temperatura ambiente, es decir, a 20°C y a presión ambiente, es decir, 101325 Pa.

La concentración de peróxido de hidrógeno se evalúa preferiblemente en las soluciones
35 mencionadas anteriormente por espectroscopía UV de acuerdo con la ecuación derivada de la ley de Beer-Lambert: $A_{240\text{nm}} = 43.6 \times l \times [\text{H}_2\text{O}_2]$ con l en centímetros y $[\text{H}_2\text{O}_2]$ en moles (Noble R.W. y col. (1970) "The reaction of ferrous horseradish peroxidase with hydrogen peroxide", *J. Biol. Chem.*, 245(9), 2409-2413).

De acuerdo con una variante específica, el compuesto peroxometálico de la solución S1 es un

compuesto peroxomolibdico.

La mezcla de la invención, por lo tanto, comprende, de acuerdo con esta variante un compuesto peroxometálico. De acuerdo con una variante preferida, la mezcla de la invención comprende un complejo peroxomolibdico.

5 De acuerdo con una variante, la solución comprende molibdato de sodio en la forma Mo(VI). Ventajosamente, al pH de las soluciones de la invención, la sal está en una forma catalítica $\text{MoO}_3\text{-BAPTA}^{3-}$ principalmente y $\text{MoO}_3\text{-EGTA}^{3-}$ principalmente, ambas fuentes de la sustancia activa MoO_4^{2-} .

De acuerdo con una modalidad particular, la mezcla de acuerdo con la invención comprende una sal, preferiblemente de sodio, de molibdeno, una mezcla de dos agentes quelantes, preferiblemente del
10 tipo BAPTA y EGTA, peróxido de hidrógeno y un agente tamponante de acetato (ácido acético/ acetato de sodio, por ejemplo).

De acuerdo con una variante específica, la mezcla de acuerdo con la presente invención comprende:

- sal de molibdato y, por ejemplo, molibdato de sodio;
- 15 - BAPTA;
- EGTA;
- H_2O_2 ;
- $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$;
- E_{redox} de 250 a 550 mV, y preferiblemente de 300 a 450 mV, y de nuevo preferiblemente de 300 a
20 420mV;
- pH 4.4 – 5.0.

De acuerdo con una variante específica, la mezcla de acuerdo con la presente invención incluye:

- sal de molibdato y, por ejemplo, molibdato de sodio;
- sal de lantano, y por ejemplo nitrato de lantano;
- 25 - BAPTA;
- EGTA;
- H_2O_2 ;
- $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$;
- E_{redox} de 250 a 550 mV, y preferiblemente de 300 a 450 mV, y de nuevo preferiblemente de 300
30 a 420 mV;
- pH 4.4 - 5.0.

Ventajosamente, los compuestos de la mezcla están en las cantidades requeridas y en las condiciones de pH y en las condiciones de potencial redox para formar un complejo de peroxomolibdato o un complejo de hidro-peroxomolibdato en donde el molibdeno es de valencia VI.

35 De acuerdo con una modalidad particular, la mezcla de la invención comprende al menos un agente quelante y, como máximo a mínimo dos agentes quelantes, y preferiblemente en una concentración de 5 a 20 μM y de 200 a 700 μM , respectivamente.

De acuerdo con una modalidad particular, la mezcla de la invención comprende de 340 mM a 450

mM del donador principal de radicales como H₂O₂.

La invención se refiere en particular a una composición de acuerdo con la invención como composición farmacéutica, comprendiendo dicha composición al menos una sal metálica, seleccionándose el metal de molibdeno (Mo), tungsteno (W), vanadio (V), oro (Au), un lantánido, en particular lantano; al menos un agente quelante; y una fuente de radicales peroxidantes. Tal composición de acuerdo con la invención es útil en un método de tratamiento terapéutico.

La invención también se refiere a un método de tratamiento terapéutico que comprende administrar, ventajosamente por aplicación tópica, a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

La invención también se refiere a un proceso para la preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para uso en un método de tratamiento terapéutico.

La invención se refiere en particular a composiciones farmacéuticas que comprenden o consisten en una mezcla de acuerdo con la invención.

La invención se refiere de esta manera a una composición farmacéutica para uso tópico, caracterizada porque comprende una mezcla terapéuticamente activa, como se define de acuerdo con la invención, o que se puede obtener de acuerdo con un método como se define en la invención.

Ventajosamente, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende de 0.001 a 5 mM, preferiblemente de 0.01 a 2 mM, y aun más preferiblemente de 0.02 a 1 mM de la mezcla farmacéuticamente activa.

La invención se refiere en particular a una composición farmacéutica para uso tópico de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento terapéutico para una infección viral, y en particular que implica un virus de la familia *Herpesviridae*.

La invención se refiere en particular a una composición farmacéutica para uso tópico de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento terapéutico para una infección que implica HSV-1 y/o HSV-2.

La invención se refiere en particular a una composición farmacéutica para uso tópico de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento terapéutico antiinflamatorio.

La invención se refiere en particular a una composición farmacéutica para uso tópico de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento terapéutico preventivo o curativo.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende molibdeno, al menos un agente quelante y una fuente de radicales peroxidados para su uso en un método para el tratamiento terapéutico del herpes. Esta composición se define de acuerdo con cualquiera de las modalidades, variantes, ventajas, preferencias o ejemplos de la invención, tomados solos o de acuerdo con cualquiera de sus combinaciones.

El término “de acuerdo con la invención” hace referencia a cualquiera de las modalidades, variantes, ventajas, preferencias o ejemplos de la invención, tomados solos o de acuerdo con cualquiera de sus combinaciones.

Típicamente, las composiciones farmacéuticas para uso tópico de acuerdo con la invención

contienen excipientes y en particular excipientes aprobados para la farmacopea.

Por tratamiento terapéutico anti-infeccioso, se entiende tanto un tratamiento terapéutico preventivo, un tratamiento profiláctico y un tratamiento curativo dando la posibilidad de, por ejemplo, limitar la infección en caso de contacto contaminante, la aparición de una enfermedad, su fase aguda con, ya sea erradicación

5 parcial o no del agente causal y/o limitación de su diseminación.

Ventajosamente, la mezcla activa o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es activa *in situ* durante su aplicación.

Ventajosamente, la mezcla activa o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es activa durante el paso trans-epitelial y preferiblemente no permite, o permite de forma limitada,

10 su paso transcutáneo.

Ventajosamente, la mezcla activa o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se desactiva durante el paso transcutáneo.

De acuerdo con una variante, la mezcla de acuerdo con la invención o una composición que la comprende se aplica por vía tópica a nivel orofacial.

15 De acuerdo con una variante, la mezcla de acuerdo con la invención o una composición que la comprende se aplica por vía tópica a nivel genital o anal.

De acuerdo con una variante, la mezcla de acuerdo con la invención o una composición que la comprende se aplica por vía tópica sobre la piel.

De acuerdo con una variante, la mezcla de acuerdo con la invención o una composición que la comprende se aplica a través de una vía tópica sobre una mucosa.

20

De acuerdo con una variante, los excipientes aprobados por farmacopeas europeas (*Ph. Eur.*), nacionales (*USP, JP, IP, Ph. Helv., Ph. Belg., Ph Fr., BP, DAB, ÖAB, en particular*) e internacionales (*Ph. Int., OMS*) pueden introducirse durante la fabricación de la invención y/o en la "mezcla" indicada como "Mezcla 1".

25 Las mezclas y composiciones de la invención son particularmente adecuadas para la actividad farmacéutica en seres humanos.

Ventajosamente, la mezcla activa de la invención permite aplicar reacciones del tipo Fenton-Haber-Weiss y "similares" a las de Fenton-Haber-Weiss, y generar preferiblemente el radical $\text{HO}_2^{\bullet}$ y en minoría los radicales $\text{O}_2^{\bullet}$, $\text{HO}^{\bullet}$.

30 De acuerdo con los inventores, la penetración de la sustancia reactiva $\text{HOO}^{\bullet}$ es suficiente para inducir de forma limitada y controlada la apoptosis celular.

De acuerdo con los inventores, la penetración de la sustancia reactiva $\text{HOO}^{\bullet}$, es suficiente para tener de forma eficiente y controlada un efecto anti-replicación viral.

De acuerdo con la invención, el potencial redox de la mezcla de la invención se usa preferiblemente

35 para limitar dentro de un alcance estrecho, las concentraciones de los precursores de las sustancias activas radicales para generar un equilibrio sano entre: un efecto anti-replicación/una citotoxicidad moderada para la célula sana/citotoxicidad significativa para la célula infectada/un efecto preventivo de la infección.

Ventajosamente, la mezcla terapéutica o farmacéuticamente activa de acuerdo con la invención

permite generar principal y preferiblemente la especie de radical reactivo $\text{HOO}^\bullet$.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, el calcio extracelular *in vivo* es el principal factor desencadenante para la producción de $\text{HOO}^\bullet$. Por ejemplo, esto es principalmente una acción al nivel del complejo $2\text{Mo}_{(\text{VI})}\text{-BAPTA}_2 (\text{H}_2\text{O}_2)$ cuando la sal de molibdeno y BAPTA participan en la mezcla de la invención. Por ejemplo, esto es principalmente una acción al nivel del complejo $2\text{Mo}_{(\text{VI})}\text{-EGTA}_2 (\text{H}_2\text{O}_2)$ cuando la sal de molibdeno y EGTA participan en la mezcla de la invención.

Ventajosamente, la producción en el medio extracelular de $\text{HOO}^\bullet$ permite modificaciones extracelulares (por ejemplo, oxidaciones de residuos de aminoácidos extra membranales) que pueden limitar la infección viral al modificar el reconocimiento celular.

Ventajosamente, la producción en el medio extracelular de $\text{HOO}^\bullet$, así como su permeación celular son compatibles con su larga vida útil (≥ 1 s) y su gran penetración celular frente a $\text{OH}^\bullet$ u $\text{O}_2^\bullet$ (1 ms y penetración del orden de nm). Ventajosamente, esta sustancia $\text{HOO}^\bullet$ está implicada en la reacción de Haber-Weiss y en la reacción de Fenton ("similar" o no) a nivel extracelular e intracelular y permite la autosuficiencia de esta última.

Ventajosamente, la mezcla que contiene $\text{Mo}(\text{IV})$ de acuerdo con la presente invención tiene un pH de 4.4 a 5.0. Esto permite especialmente la optimización de la constante de velocidad de k_{obs} ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) de la descomposición $\text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2^\bullet$.

Ventajosamente, la modificación del potencial redox intracelular al ponerse en contacto con la composición de acuerdo con la invención permite un equilibrio apoptótico/antiapoptótico. Más particularmente, este equilibrio apoptótico/antiapoptótico depende notablemente de la existencia de una infección por HSV y principalmente por HSV-1 y -2.

De acuerdo con una variante, la mezcla de la invención es selectivamente activa en células infectadas por HSV y principalmente por HSV-1 y -2.

Por lo tanto, existe un equilibrio cercano entre las vías del estrés inducidas por la infección por HSV, incluida la afluencia de calcio y la regulación de la apoptosis.

Este equilibrio está perturbado por la presencia de radicales intra-citoplásmicos y de las modificaciones del potencial redox celular. Esto induce las mismas vías de estrés celular que una infección por HSV, las mismas afluencias de calcio y las mismas inducciones de las vías metabólicas, estas mismas vías están reguladas por retro-regulación hacia otro equilibrio antiapoptótico. Esto apoya el efecto terapéutico de la mezcla de acuerdo con la invención o de las composiciones que la comprenden.

De acuerdo con una variante, la composición farmacéutica o la mezcla de la invención se usa en un método de tratamiento terapéutico para un herpes labial y orofacial.

De acuerdo con una variante, la composición farmacéutica o la mezcla de acuerdo con la invención se usa en un método de tratamiento terapéutico de un herpes genital y anal.

De acuerdo con una modalidad, la mezcla activa de acuerdo con la invención tiene una eficacia anti-infecciosa (acción directa de moderada a baja en el virus, receptores virales en la célula como posibles candidatos), anti-reconocimiento e internalización (acción importante, receptores celulares del virus). Estas eficiencias son externas a la célula y limitan la infectividad viral. Por lo tanto, la mezcla activa de acuerdo

con la invención tiene una acción profiláctica. Asimismo, la mezcla activa de acuerdo con la invención tiene una eficacia anti-infecciosa.

De acuerdo con una variante, la composición farmacéutica o la mezcla de acuerdo con la invención se usa en un tratamiento terapéutico de una población que expresa HSV en su forma envuelta, de replicación o infecciosa.

De acuerdo con una variante, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención o la mezcla se usa en un tratamiento terapéutico de una población celular o de un tejido que expresa HSV-1 (Kessler HH y col. (2000) "Detection of *Herpes Simplex* Virus DNA by real-time PCR", *J Clin Microbiol.*, 38(7), 2638-2642).

De acuerdo con una variante, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención o la mezcla se usa en un tratamiento terapéutico de una población celular o de un tejido que expresa HSV-2 (Kessler HH y col. (2000) "Detection of *Herpes Simplex* Virus DNA by real-time PCR", *J Clin Microbiol.*, 38(7), 2638-2642).

Ventajosamente, la mezcla activa de acuerdo con la invención tiene una eficacia anti-replicación inducida por un contacto preliminar a la infección con una célula o tejido sano. La mezcla activa de acuerdo con la invención se puede usar para prevenir una infección limitando la replicación viral intracelular y/o limitando la penetración del virus en la célula.

Ventajosamente, la mezcla activa de acuerdo con la invención tiene una eficacia anti-replicación preferente sobre el metabolismo celular de la célula infectada (vías de estrés oxidativo y canales de calcio). La mezcla activa de acuerdo con la invención se puede usar específicamente para actuar directamente contra la replicación viral intracelular y contra una sobreinfección celular por HSV-1 y/o HSV-2 del mismo tejido infectado o de un tejido sano próximo al anterior.

De acuerdo con una variante, la mezcla activa de acuerdo con la invención induce de forma heterogénea una inhibición de la producción de interleucina-6 (IL-6) de un trozo cutáneo humano y, por lo tanto, tiene una eficacia antiinflamatoria.

En las figuras:

La figura 1 representa las variaciones del potencial redox y de la concentración de H_2O_2 durante la preparación de la mezcla 1.

La figura 2 ilustra un nomograma del Fe^{3+} usado para ensayar la eficacia redox de la mezcla 1.

La figura 3 es una ilustración de la eficacia redox de la mezcla 1 en diferentes concentraciones de la misma (absorbancia de quercetina por Fe(III)) en un medio plasmático humano después del contacto (2 minutos) con la Mezcla 1 (en nM MoO_4^{2-}).

La figura 4 ilustra un nomograma de la eficacia redox de la mezcla 1 en diferentes concentraciones de la última.

La figura 5 ilustra la influencia de la mezcla 1 en diferentes concentraciones de MoO_4^{2-} en la producción *in situ* en plasma humano de Fe^{3+} , i) procedente del complejo transferrina- Fe^{3+} después de estar en contacto con la formulación, ii) en el equilibrio $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ y, iii) en la oxidación de quercetina.

La figura 6 ilustra la producción de interleuquina-6 (IL-6) en los sobrenadantes de cultivo de

biopsias de piel humana no patológicas (2 minutos) estimuladas por la mezcla 1 (24.3 μM de la sustancia activa) o NaCl (100 mM) como control. (D1-5: donante 1 a 5, B1 o 2: biopsia 1 o 2).

La figura 7 ilustra el promedio de la producción a las 6h y 24h después del contacto con interleucina-6 (IL-6) en los sobrenadantes de cultivo de biopsia no patológica de piel humana estimulada (2 minutos) por la mezcla 1 (24.3 μM de la sustancia activa) o NaCl (100 mM) como control.

La figura 8 es una representación de la eficacia redox de la mezcla 1 y la mezcla 2 en diferentes concentraciones (absorbancia de quercetina por Fe(III) en medio plasmático humano después del contacto (2 min) con mezcla 1 (en nM MoO_4^{2-}) o con mezcla 2 (en nM $\text{La}(\text{MoO}_4)^{1-}$).

Ejemplos

Ejemplo 1 - Ejemplo de una mezcla activa de acuerdo con la invención

El presente ejemplo está hecho con una sal de molibdeno. Se prepara una composición de la fórmula de acuerdo con la tabla 1 ("Mezcla 1"), expresada en la concentración inicial de los componentes:

Tabla 1

Componentes	Mezcla de acuerdo con la invención
Molibdato de sodio	20.7 μM
BAPTA	12.6 μM
EGTA	526 μM
H_2O_2	353mM
$\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$	70mM
Ph (con NaOH)	4.4 – 5.0
E°_{redox}	300 to 420Mv

Se dice que la composición es una composición «inicial», ya que corresponde a las concentraciones de los reactivos añadidos sin tener en cuenta el proceso catalítico aplicado.

Todos los componentes utilizados para la síntesis, así como el producto terminado son validados por su espectro IR-FT.

Tabla 1bis

Producto	Pureza	Fórmula cruda	CAS No.
Molibdato de sodio dihidratado	98-103%	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10102-40-6
BAPTA : (ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano- N,N,N',N' -tetraacético)	$\geq 98\%$	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	85233-19-8
EGTA: (ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)- N,N,N',N' -tetraacético)	$\geq 99\%$	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	67-42-5
Peróxido de hidrógeno	29-31%	H_2O_2	722-84-1
Ácido acético glacial	99.8-100.5%	CH_3COOH	64-19-7
Acetato de sodio trihidratado	99-101%	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5010524
Hidróxido de sodio	10N	NaOH	1310-73-2
Agua desmineralizada	1 μS	H_2O	7732-18-5

Las cifras de las mediciones realizadas durante y después de la síntesis son los promedios de las 3 producciones.

Las cantidades indicadas a continuación son para la preparación de un litro de mezcla 1.

A - ETAPA (i): preparación de la solución tamponante (solución ST)

CH_3COOH (100%; δ : 1.05 g.cm⁻³ (líquido, 20°C)) 4.0 mL (70 mM finales)

CH ₃ COONa.3H ₂ O (100%)	8g (59mM finales)
Agua	c.b.p. 1L
Verificación del pH:	4.7-4.8
Temperatura ambiente (20°C)	

5 **B - ETAPA (ii): preparación de la solución del complejo metálico (solución SC)**

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (fuente de Mo(VI); 100%)	200 mg (2.4 mM finales)
Agua	c.b.p. 340 mL
Agitación suave, temperatura ambiente	

C - ETAPA (iii): preparación de la solución inicial (Si1)

10	Agua	900mL
	CH ₃ COOH (100%)	4 mL (70 mM)
	Agregue muy lentamente y con una leve agitación (250 rpm),	
	pH: 2.9-3.8	
	E _{redox} : 470-490mV	
15	después,	
	H ₂ O ₂ (30%)	c.b.p. para el 1.2% <u>en peso</u> final y
	de acuerdo con los ensayos preliminares	

En 45 minutos:

pH: 2.70-2.90

20 E_{redox}: 440-460mV

Por la ecuación de Noble: [H₂O₂] = 380-410mM (Solución Si1)

D - ETAPA (iv): preparación de la solución inicial (Si2)

	Introduzca la "solución ST" en la solución Si1	12mL (≈1mM de acetato)
	Agregue con agitación suave.	
25	<u>En 45 minutos:</u>	
	pH: ≈ 2.90	
	E _{redox} : 460-480mV	
	Por la ecuación de Noble: [H ₂ O ₂] = 360-410mM (Solución Si2)	

E - ETAPA (v): preparación de la solución peroxomolibdica S1

30	Introduzca la "solución SC" en la solución Si2	10mL
	<u>En 45 minutos:</u>	
	pH: 2.80-3.00	
	E _{redox} : 450-480mV	
	Por la ecuación de Noble: [H ₂ O ₂] = 370-400mM (Solución S1)	

35 **F - ETAPA (vi): preparación de la solución S2**

Ajuste del pH con agitación suave:

NaOH 9.9-10.1M 3.6 mL para = 0.9L de la mezcla 1

pH 4.5-5.0

En 45 minutos:

pH: 4.60

E_{redox} : 380-390mV

(Solución S2)

G - ETAPA (vii): Adición de los agentes quelantes - Preparación de la solución S4

- 5 Introducción de BAPTA (98.8%) 6mg / L,
después de una disolución muy lenta de BAPTA con agitación suave en una alícuota de la formulación S2 (1.4 L) equilibrada previamente a 25°C (la solución llamada "S3.1").

Agrupe la solución S3.1 con la solución S2 para formar la solución S3.2.

En 45 minutos:

- 10 pH: 4.40-4.70

E_{redox} : 380-390mV

Por la ecuación de Noble: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 370\text{-}390\text{mM}$

Introducción de EGTA (99.1%)

200 mg/L en la solución S3.2 para

formar la solución S4

- 15 Disuelva con agitación suave.

En 45 minutos:

pH: 4.40-4.60

E_{redox} : 380-390mV

Por la ecuación de Noble: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 370\text{-}420\text{mM}$

- 20 **H - ETAPA (viii): ajuste del pH**

Ajuste del pH (NaOH 9.9-10.1M, es decir, $\approx 400\text{ g/L}$) $\Rightarrow$ pH: 4.60 ± 0.2

I - ETAPA (ix): ajuste del volumen para la solución final (SF)

Ajuste del volumen con agua desmineralizada

c.b.p. 1 litro

En 12-18 horas:

- 25 pH: 4.50-4.70

E_{redox} : 380-390mV

Por la ecuación de Noble: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 350\text{-}380\text{mM}$

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

Densidad: $\delta = 1.004\text{ g/mL}$

- 30 La mezcla de acuerdo con la invención, lista para usar, es estable en la oscuridad durante más de 6 meses a temperatura ambiente o a 45°C.

El hidro-peroxo-molibdato de Na está en una concentración de $24.3\text{ }\mu\text{M}$ en la mezcla 1 final.

Ejemplo 2 - Firma por variación del potencial redox

- 35 La firma de la mezcla activa de acuerdo con la presente invención se evalúa mediante la variación del potencial redox durante la síntesis de una composición preparada de acuerdo con el Ejemplo 1.

De acuerdo con la figura 1, con respecto a la solución inicial ($\approx 470\text{mV}$, etapa 3), reducción del potencial redox de $\approx 90\text{mV}$ ($\approx 380\text{mV}$) en la etapa 6 (ajuste del pH con sosa). El potencial redox permanece constante hasta el final de la síntesis (etapa 9). Lo mismo aplica durante el envejecimiento de las

formulaciones de la mezcla de la invención de acuerdo con el ejemplo 1 durante 6 meses a temperatura ambiente ($389 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$) y a 45°C ($389 \text{ mV} \pm 8 \text{ mV}$) para un pH de 4.56 ± 0.40 y 4.53 ± 0.41 , respectivamente.

Ejemplo 3 - Firma por consumo y producción de H_2O_2 - generación del equilibrio peroxo-reactivo y del potencial redox de la mezcla 1.

La firma de la mezcla activa de acuerdo con la presente invención se evalúa mediante el consumo y la producción de H_2O_2 durante la síntesis de una composición preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

De acuerdo con la figura 1, con respecto a la concentración de H_2O_2 de la solución inicial (353 mM, etapa 3 a t_0), se observa una producción repentina de peróxido ($\approx 42 \text{ mM}$, que incluye una pequeña fracción de ácido peracético) debido a la adición de H_2O_2 en el solución tampón (ácido acético/acetato). Si la adición de H_2O_2 no se lleva a cabo en una solución acuosa tamponada con ácido previamente (etapa 3, $\text{pH} = 2.84 \pm 0.1$), su degradación espontánea y rápida se produciría debido a un pH demasiado alto (agua) ($\text{pK}_{\text{aH}_2\text{O}_2} = 4.8$).

Desde la etapa 4 hasta la etapa 7, se observa un consumo limitado de H_2O_2 ($10 \text{ mM} \pm 6 \text{ mM}$), hasta su estabilización a $381 \text{ mM} \pm 5 \text{ mM}$ (etapa 7; + BAPTA).

La adición de EGTA desplaza el equilibrio de peróxido (reacción "similar" a la de Fenton) por degradación de peróxido, es decir, $393 \text{ mM} \pm 29 \text{ mM}$ en la etapa 7, a $357 \text{ mM} \pm 26 \text{ mM}$ en la etapa 9 y $365 \text{ mM} \pm 15 \text{ mM}$ en la etapa 9 + 12 horas.

En la etapa 6, se observa una caída repentina en el potencial redox (de $463 \text{ mV} \pm 15 \text{ mV}$ a $392 \text{ mV} \pm 17 \text{ mV}$) mediante el ajuste del pH. La adición (etapa 7) de los agentes quelantes BAPTA y luego EGTA contribuye sucesivamente a la estabilización del potencial redox ($386 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$ y $383 \text{ mV} \pm 6 \text{ mV}$) mediante la estabilización de los equilibrios químicos.

Ejemplo 4 - Ensayo de la eficacia redox de la mezcla de la invención: métodos de quercetina

A - Las soluciones reactivas

1 - Quercetina

Una solución de quercetina dihidratada (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona dihidratada, 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona dihidratada; ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 10^{-3} mol/L se prepara en metanol.

2 - Solución clorhídrica

Se prepara una primera solución de ácido clorhídrico 1M en metanol. Se prepara una segunda solución a 0.3 M en metanol. La solución reactiva se prepara agregando 343 μL de la solución 1M a 1,357 μL de la solución 0.3 M.

3 - Soluciones de Fe^{3+} (nomograma de referencia)

Se prepara una solución de Fe^{3+} ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) a 2 mg/mL en agua HPLC. Se diluye en seguida para obtener ocho soluciones de referencia a: 20, 100, 200, 300, 400, 500, 1,000 y 1,500 $\mu\text{g/mL}$. Estas soluciones finalmente se diluyen 20 veces en plasma humano o en agua HPLC para obtener finalmente las concentraciones de: 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 y 75 $\mu\text{g/mL}$.

4 - Soluciones de Fe^{2+} (nomograma de referencia, control de actividad)

Se prepara una solución de Fe^{2+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 89 mg/mL en agua HPLC. Se diluye en seguida para obtener tres soluciones de referencia a 0.445, 4.45 y 44.5 mg/mL. Estas soluciones finalmente se diluyen 10 veces en agua HPLC para obtener finalmente concentraciones de: 0, 0.0445, 0.445 y 4.45 mg/mL.

5 B - Ensayos mediante el método de quercetina

La presencia de Fe^{3+} (nomograma) o su producción (nomograma de Fe^{2+} y eficacia de la mezcla de la invención después de 2 minutos de contacto) se cuantifican mediante el método de quercetina.

De acuerdo con las condiciones de análisis o uso de la mezcla 1:

“mezcla_{ox}” se refiere a la mezcla de acuerdo con la invención como un oxidante.

10 “mezcla_{red}” se refiere a la mezcla de acuerdo con la invención como un agente reductor.

Las producciones de Fe^{3+} son las siguientes:



15 La reacción (1) se lleva a cabo en un medio plasmático.

La reacción (2) se lleva a cabo en un medio plasmático o en agua de HPLC y corresponde al equilibrio de la reacción de Fenton-Haber-Weiss.

La reacción (3) es la reacción de oxidación de la quercetina para evaluar el potencial redox de la mezcla 1.

20 En un medio ácido ya 70°C, la quercetina se oxida específicamente con hierro férrico (Fe^{3+} , El Hajji y col. 2006 y Balcerzak et al, 2008) soportado por la transferrina en un medio plasmático y no por hierro ferroso (Fe^{2+}). El ion de Fe^{3+} es soluble en estas condiciones.

Se agregaron 30 μL de la solución de quercetina a 170 μL de la solución reactiva clorhídrica. Después de la homogeneización, se agregaron 50 μL de la muestra (Fe^{3+} en plasma humano o en agua HPLC, Fe^{2+} en agua HPLC, la mezcla de la invención después de 2 minutos de contacto con plasma humano). Las soluciones se agitan intensamente y poco después se incuban durante 1 hora a 70°C. Después de la incubación, las muestras se centrifugan durante 15 min a 14,000 rpm y a temperatura ambiente. Se toman muestras de 100 μL de sobrenadantes. El espectro UV de cada muestra se adquiere de 230 a 500 nm. Las muestras: agua, Fe^{2+} , Fe^{3+} , plasma se extraen de acuerdo con el tipo de experimento.

30 El pico de absorción de la quercetina oxidada por el Fe^{3+} producido a partir de la transferrina plasmática y la reacción de Fenton-Haber-Weiss *in situ* se conserva (desde 285-305 nm).

El vértice de la curva se centra hacia 292 nm cuando el experimento se lleva a cabo en agua de HPLC o en plasma. Se puede desplazar un máximo de 10 nm cuando se extraen las muestras experimentales.

35 1 – Nomograma de Fe^{3+}

Se produce un nomograma para el ion $\text{Fe}(\text{III})$, por ejemplo, midiendo la absorbancia UV (en la gama de 250-330 nm) de quercetina oxidada para diferentes concentraciones de Fe^{3+} (ver la gama de Fe^{3+} anterior) en plasma humano, y mediante el informe de densidad óptica frente a la longitud de onda.

A partir del espectro de la región 250-330 nm, el área bajo la curva (AUC) entre 285 y 305 nm se calcula con la fórmula:

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

En consecuencia, cada área de la superficie del pico 285 - 305nm para cada punto del rango de Fe^{3+} se traza para la ilustración gráfica. La curva de tendencia se traza (Excel), la ecuación (el coeficiente de correlación R^2 cuyo valor más cercano a 1 valida el experimento) se deduce (Excel).

Puede ser una forma lineal o polinómica del tipo: $y = ax^2 + bx + c$. Por experiencia, esta relación puede ser del tipo $y = -0.0021x^2 + 0.4819x + 0.4521$; $R^2 = 0.9966$ (figura 2). (4)

Para una mezcla de acuerdo con la invención, la concentración de Fe^{3+} equivalente producido en un medio plasmático o de Fe^{2+} es el reflejo del potencial oxidante de la invención y se calcula a partir de la ecuación (4). Este es un método indirecto para medir la eficacia redox de la mezcla 1 mediante el ensayo en luz UV de la quercetina oxidada por Fe^{3+} . Por consiguiente, se menciona una concentración en Fe^{3+} "equivalente". Además, es posible comparar el potencial redox de una solución de acuerdo con la invención a ensayar, con respecto a una solución de referencia de acuerdo con la invención, en otras palabras, hacer una comparación con la cuantificación de la eficacia redox de una mezcla de acuerdo con la invención.

2 – Nomograma de Fe^{2+}

De la misma manera que para el ion $Fe(III)$, se produce un nomograma para el ion $Fe(II)$. Por ejemplo, la absorbancia UV (230-500 nm) del pico de quercetina oxidada por Fe^{3+} obtenido a partir de la mezcla de la invención a 1.22 μM de sustancia activa (250 $\mu g/L$) y 2 minutos de contacto con Fe^{2+} se mide por ejemplo para el rango descrito anteriormente. Se pueden llevar a cabo los mismos análisis matemáticos de AUC como se describe para el ion $Fe(III)$.

3 - Ensayo de la eficacia redox de la mezcla de la invención, por ejemplo, a 1.22 μM (250 $\mu g/L$) de sustancia activa MoO_4^{2-} .

De acuerdo con el protocolo descrito en B-, la eficacia redox de una mezcla de acuerdo con la invención (1.22 μM de MoO_4^{2-} en plasma humano) se prueba para: i) evaluar su envejecimiento a temperatura ambiente y a 45°C, ii) validar su producción y evaluar comparativamente las formulaciones, iii) cuantificar su pasaje transcutáneo, iv) su biodisponibilidad y, v) su biofase.

De acuerdo con la ecuación (4), se calcula el área específica del pico de absorbancia UV (como AUC) entre 285 y 305 nm del pico de quercetina oxidada por Fe^{3+} libre producido después del contacto con el plasma durante 2 minutos de la mezcla de la invención (ecuaciones (1), (2) y (3)) en una concentración final de 1.22 μM con el complejo transferrina- Fe^{3+} . En promedio, la producción de Fe^{3+} equivalente (Fe^{3+}_{eq}) es del orden de 30 a 50 $\mu g/mL$ de plasma.

4 - Estimación del nomograma en medio plasmático de la concentración efectiva de la mezcla de acuerdo con la invención

El hierro plasmático no está en forma libre. Está unido a la transferrina (o siderofilina) en su forma férrica (Fe^{3+}) en una cantidad de 1 a 2 residuos por molécula. El hierro en su forma ferrosa (Fe^{2+}) no está

circulando fuera de su complejación con la hemoglobina. Se considera que el plasma humano utilizado no está hemolizado. La reacción de quercetina de la mezcla de la invención con cobre en plasma se considera insignificante.

Se incubó una gama de concentraciones de la mezcla de la invención (15.2, 7.6, 3.8 y 1.9 nM de MoO_4^{2-} final) en plasma humano. La reacción con quercetina se realizó como se describe en B-. El pico de absorción específico (substracción de la muestra de plasma + quercetina) se integró como se describe en B-1 (figura 3).

El nomograma se trazó (Excel) en una escala polinómica y se calculó la ecuación de tendencia ($y = 0.0144x^2 + 0.5863x + 0.4511$ con $R^2 = 0.9934$ (5); figura 4).

Se determina una relación de proporcionalidad (ecuación 5) entre la cantidad de la invención en una concentración añadida al plasma humano y la cantidad de equivalente de Fe^{3+} (ecuación 4) detectada por reacción de oxidación de quercetina, es decir, 28.95, 12.19, 3.97, 3.12 μg de Fe^{3+} eq/mL de plasma humano, de acuerdo con el intervalo de la mezcla de la invención descrita anteriormente.

Ejemplo 5 - Evaluación de la eficacia de oxidación-reducción de la invención en plasma humano

Después de agregar la Mezcla de acuerdo con la invención (Ejemplo 1 – “mezcla 1”) a plasma humano y después de un tiempo de contacto de 2 minutos, hasta una concentración de 0.03038 μM de MoO_4^{2-} , se produjo la reacción de oxidación de la quercetina para la producción de Fe^{3+} del complejo plasmático de transferrina- Fe^{3+} y la reacción de Fenton-Haber-Weiss es óptima y lineal (ver el ejemplo 4).

Después de la substracción de las muestras experimentales, un aumento en la concentración de la invención genera una reducción en la producción *in situ* de quercetina oxidada por Fe^{3+} debido al desplazamiento del equilibrio de la reacción de Fenton-Haber-Weiss ($\text{Fe}^{3+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$). Las concentraciones probadas finales de MoO_4^{2-} fueron entonces de 0.00, 1.22, 4.05, 12.15, 24.30 y 30.38 μM (figura 5).

Ejemplo 6 - Eficacia anti-replicación

A - Los modelos

- Se evaluaron cuatro modelos de contacto de la mezcla de acuerdo con el ejemplo 1 (“Mezcla 1”). Estos representan las cuatro posibilidades fisiológicas que la mezcla 1 puede encontrarse durante una aplicación terapéutica tópica, es decir:

Modelo 1: Mezcla 1 en células infectadas con HSV-1,

Modelo 2: Mezcla 1 en células aun no infectadas con HSV-1,

Modelo 3: Mezcla 1 en células aun no infectadas y mezcla 1 en HSV-1 libre (no infectadas aun),

Modelo 4: Mezcla 1 en HSV-1 antes de la infección.

- Se evaluaron dos tiempos de contacto de la mezcla 1, es decir, 2 minutos o 1.5 minutos, y luego la eliminación de la mezcla 1.

- Se evaluaron dos concentraciones de la mezcla 1: 0.81 y 2.03 μM de sustancia activa, es decir, 167 y 417 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

- El método para cuantificar las eficiencias es qPCR (Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa; Mullis K. y col. (1986) “Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction”, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 51 (Pt 1), 263-273.)

- La eficacia anti-replicación (EA) de la mezcla 1 en HSV 1 se evaluó en qPCR con cebadores específicos del genoma viral (Kessler H.H. y col. (2000) "Detection of Herpes simplex virus DNA by real-time PCR" J. Clin. Microbiol., 38(7), 2638-2642).

- La citotoxicidad de la mezcla 1 (C) sobre la línea BHK-21 se evaluó en qPCR con cebadores específicos del gen de la pequeña subunidad ribosómica 18S (Texcell - Evry, Francia).

- La multiplicidad de infección (MOI): 1, es decir, $5 \cdot 10^5$ TCID₅₀ (dosis infectiva de cultivo de tejido, por sus siglas en inglés, 50%).

- Los experimentos de qPCR se realizaron a t0h (2 h después del contacto entre BHK-21 y HSV-1, y luego la eliminación de HSV-1), t2h-, t4h- y t8h después de la infección.

- La relación EA/C nos da el Índice de Eficiencia *in vitro* (IE) de la mezcla 1 correspondiente a un modelo de estudio.

Modelo 1:

BHK-21 + HSV-1 (2 h; infección) => lavado (PBS) para eliminación viral => muestras t0h => + Mezcla 1 (2 min.) => Lavado (medio de cultivo) para eliminar la mezcla 1 => incubación celular a 37°C => muestras t2h-, t4h- y t8h después de la infección.

Modelo 2:

BHK-21 + Mezcla 1 (1.5 y 2 min) => lavado (PBS) para eliminar la mezcla 1 => células + HSV-1 (2 h; infección) => lavado (medio de cultivo) para eliminar HSV-1 => muestras t0h => incubación de células a 37°C => muestras t2h-, t4h- y t8h después de la infección.

Modelo 3:

BHK-21 + Mezcla 1 (1.5 y 2 minutos) => lavado (PBS) para eliminar la mezcla 1.

HSV-1 + Mezcla 1 (1.5 y 2 min) => lavado (PBS) para eliminar la mezcla 1.

Agrupación de células y de los virus que han estado en contacto preliminar con la mezcla 1 (2 h; infección) => lavado (medio de cultivo) para eliminar HSV-1 => muestras t0h => incubación celular a 37°C => muestras t2h-, t4h- y t8h después de la infección.

Modelo 4:

HSV-1 + Mezcla 1 (2 min) => lavado (PBS) para eliminar la mezcla 1 => + BHK-21 (2 h; infección) => lavado (medio de cultivo) para eliminar HSV-1 => muestras t0h => incubación de células a 37°C => muestras t2h-, t4h- y t8h después de la infección.

B - Resultados

Tabla 2: Reducción a las 8 horas de la multiplicación de HSV-1 en células BHK-21 después del contacto con la mezcla 1 (en µg/L de sustancia activa) o de aciclovir (ACV); Índice de eficiencia *in vitro* (IE).

Substancia	Reducción de la replicación de HSV-1 a t8h (%)*					EI a t8h / modelo**				
	Mezcla 1		ACV	Mezcla 1		Mezcla 1		ACV	Mezcla 1	
Tiempo de contacto (min.)	2	2	2	1.5	1.5	2	2	2	1.5	1.5
Concentración (µg/L)	167	417	10 ³	167	417	167	417	10 ³	167	417
Modelo 1	-97	-98	-12	NT	NT	37	48	2	NT	NT

<i>Modelo 2</i>	-72	-96	-1	-70	-86	4	23	1	3	7
<i>Modelo 3</i>	-93	-97	-6	-78	-90	14	35	1	4	10
<i>Modelo 4</i>	-56	-69	-52 [#]	NT	NT	2	3	2 [#]	NT	NT

* La reducción de la replicación de HSV (RR) por las sustancias evaluadas (Mezcla 1, control con aciclovir) se expresa como un porcentaje y corresponde a la proporción de cuantificaciones de qPCR de los genomas de HSV-1 y de la citotoxicidad que se evalúa cuantificando la subunidad 18S de la célula huésped: $RR = \{ (100 \times ([HSV-1]_{prueba} / [18S]_{prueba})) / ([HSV-1]_{control+} / [18S]_{control+}) \} - 100$.

** El índice de eficacia anti-replicación *in vitro* (EI) de las sustancias evaluadas está representado por la proporción $([HSV-1] / [18S])$ evaluado en qPCR específico) del control positivo infectado por HSV ($[HSV-1]_{control+} / [18S]_{control+}$) vs. la de las sustancias evaluadas (Mezcla 1, control con aciclovir): $EI = ([HSV-1]_{control+} / [18S]_{control+}) / ([HSV-1]_{prueba} / [18S]_{prueba})$.

[ACV]: 1 g/L

- Las mejores EI (Tabla 2) se obtienen después de 2 minutos de contacto de la mezcla 1 y de una concentración a 417 µg/L. Notamos una influencia significativa del tiempo de contacto en las EI (1.5 minutos y 2 minutos, *modelos 2 y 3*).

Las EI obtenidas con los *modelos 1 y 3* con un tiempo de contacto de 2 minutos y una concentración de la mezcla 1 de 167 µg/L son particularmente significativas.

- Independientemente del modelo, las EI obtenidas con aciclovir ("ACV") no son significativas (Tabla 2).

Tabla 3: Porcentajes de cuantificación por qPCR (gen 18S o HSV; a las 8 h después del contacto de 2 minutos): i) de la multiplicación de la línea BHK-21 (control: línea no infectada) y, ii) de la replicación de HSV-1 (control: línea infectada).

Gen/genoma	18S (%)						HSV (%)		
Control	Línea + (PBS – HSV)			Línea + (PBS + HSV)					
Sustancia de prueba	Mixture 1		ACV (mg/L)	Mixture 1		ACV (mg/L)	Mixture 1		ACV (mg/L)
[sustancia activa]	167 µg/L	417 µg/L		167 µg/L	417 µg/L		167 µg/L	417 µg/L	
Modelo 1	45	27	108 (1)	49	30	118 (1)	1	< 1	76 (1)
Modelo 2	62	41	57 (1)	68	44	62 (1)	19	2	61 (1)
Modelo 3	118	70	111 (1)	98	58	92 (1)	7	2	86 (1)
Modelo 4	120	107	97 (10 ³)	139	123	111 (10 ³)	64	38	54 (10 ³)
Pruebas	1	2	3	4	5	6	7	8	9

- Para la mezcla 1 (a 167 a 417 µg/L) o ACV (a 1 o 103 mg/L), independientemente del control utilizado (línea + PBS - HSV o línea + PBS + HSV), los resultados de cuantificación de 18S son comparables para un mismo modelo (Tabla 3, prueba 1 vs. 4, 2 vs. 5, 3 vs. 6).

- Para la mezcla 1, se determina una eficiencia anti-replicación notable dependiente de la dosis (Tabla 3, pruebas 7 y 8) para los modelos 1, 2 y 3. Esto no se observa para el ACV (Tabla 3, prueba 9).

- Se observa una citotoxicidad comparable de la mezcla 1 (167 µg/L) y de ACV (1 mg/L) (Tabla 3) de acuerdo con los modelos 2 y 3 (Tabla 3, pruebas 1, 3, 4 y 6).

5 - Se observa una ausencia de eficacia anti-HSV (Tabla 2 y Tabla 3, prueba 9) para ACV (1 mg/L o 1g/L). Los modelos introducidos para el estudio de la mezcla 1 no pueden corresponder a un estudio sobre ACV.

Para el *modelo 1* (Mezcla 1 en las células infectadas):

10 - La mejor EI (Tabla 2) con dos concentraciones de la mezcla 1 (2 minutos de contacto, 167 y 417 µg/L, EI: 37 y 48, respectivamente).

- La mezcla 1 tiene eficacia directa (Tablas 2 y 3) en la replicación viral intranuclear, en el metabolismo celular probablemente.

- La mezcla 1 tiene una buena especificidad de la célula infectada (Tabla 3, pruebas 4 y 5, modelo 1 frente a 2).

15 Para el *modelo 2* (Mezcla 1 en una célula antes de la infección):

- Una EI interesante (Tabla 2; contacto durante 2 minutos y 417 µg/L, EI: 23).

- La mezcla 1 tiene una acción en la célula que se vuelve menos receptiva a la infección y/o adquiere un metabolismo incompatible con la replicación del virus (Tabla 3, pruebas 7 y 8).

Para el *modelo 3* (Mezcla 1 en: célula no infectada y HSV-1, por separado y antes de la agrupación):

20 - Una EI interesante (Tabla 2) con dos concentraciones de la mezcla 1 (2 minutos de contacto, 167 y 417 µg/L, EI: 14 y 35, respectivamente).

- Dependiendo de la dosis aplicada (167 o 417 µg/L), citotoxicidad nula (Tabla 3, prueba 4) o citotoxicidad limitada (Tabla 3, prueba 5) para una eficacia antiviral muy buena (Tabla 3, pruebas 7 y 8, respectivamente).

25 - Tenemos una eficiencia de la mezcla 1 que sería una acumulación del *modelo 2* con una acción significativa sobre la célula y del *modelo 4* con una acción limitada solo sobre el virus (tablas 2 y 3).

Para el *modelo 4* (Mezcla 1 en HSV-1):

- Una EI baja (tiempo de contacto: 2 minutos, 167 y 417 µg/L, EI: 2 y 3, respectivamente, Tabla 2) que se confirma por ausencia de citotoxicidad pero replicación viral significativa (Tabla 3, pruebas 8 y 9).

30 C - Conclusiones

En la línea BHK-21, las principales eficiencias de la mezcla 1 son: i) tener una citotoxicidad preferencial de la célula infectada, ii) inhibir la replicación viral en la célula infectada y, iii) limitar la infección de la célula sana.

35 El objetivo puede ser una membrana (receptores para el virus, por ejemplo) y/o metabólico (regulación del estrés y vías apoptóticas, por ejemplo).

Reconocimiento e internalización viral

De acuerdo con el *modelo 4*, la mezcla 1 tiene una baja eficacia anti-replicación directa al nivel del virus. En estas condiciones experimentales, cerca del uso terapéutico tópico, esta observación es a favor

de una alteración limitada de los receptores virales a la célula: gB (HSV-2), gC (HSV-1), gD y gH/gL (HSV-1 y -2). La mezcla 1 solo alteraría de forma limitada las glucoproteínas virales por su reacción de Fenton-Haber-Weiss *in vitro*.

De manera similar, no observamos la influencia significativa de la mezcla 1 en la membrana de fosfolípidos del HSV que puede perturbar la fusión y penetración de la membrana.

Bajo estas condiciones experimentales, la mezcla 1 no es un virucida.

La replicación viral y el metabolismo celular:

La técnica qPCR usa el lisado celular a las 8 h después de la infección. Una reducción en la replicación viral puede resultar en un reconocimiento y/o una internalización y/o replicación deficientes (modificación del metabolismo celular inducido por la infección y/o la mezcla 1).

Si la vía de desalinización viral fue alterada por la mezcla 1 sin alterar las otras vías e independientemente del modelo, las EI resultantes serían mucho más pequeñas debido a la acumulación de viriones en el citoplasma.

De acuerdo con el *modelo 2* (IE: 23 con 2 minutos de tiempo de contacto y 417 µg/L), se observa una baja replicación viral después del contacto celular preliminar con la mezcla 1 (Tabla 2 y Tabla 3, prueba 8).

Fe acuerdo con este modelo, la célula BHK-21 estuvo en contacto durante 2 minutos con la mezcla 1. El tiempo de contacto con HSV en un medio de cultivo completo y nutritivo fue de 2 horas. La mezcla 1 indujo modificaciones celulares que duraban más de 2 horas y predecían la eficacia profiláctica de la mezcla 1.

Además del reconocimiento de HSV-1 por parte de la célula afectada parcialmente por la mezcla 1 debido a su acción probable y limitada sobre la glicoproteína viral gD (38% de replicación, Tabla 2), este reconocimiento también puede verse afectado por una acción sobre los receptores celulares a gD (HVEM y nectina) así como en los otros dos receptores de células de superficie a gB y gH/gL que son sulfatos e integrinas de heparano.

Debido a la permeación radical (modificación del potencial redox intracelular o transmembranal, regulación de las vías de estrés oxidativo), las afluencias de calcio celular pueden moverse. Estas afluencias de calcio celular también son inducidas por la infección por HSV. Sin embargo, este último puede desmovilizarse inmediatamente debido a la introducción en la mezcla 1 de agentes quelantes libres y no permeables (limitación de la citotoxicidad celular). Por otro lado, no se deben excluir otras modificaciones importantes de las células y pueden corresponder a oxidaciones o reducciones de proteínas (puentes de cisteinilo, por ejemplo) y, en particular, a proteínas estructurales que pueden producirse en la endocitosis viral.

De acuerdo con el *modelo 3* (Tabla 2 y Tabla 3, pruebas 7 y 8), se observa una reducción significativa en la replicación viral (IE: 14 y 35 durante 2 minutos de tiempo de contacto, 167 y 417 µg/L, respectivamente).

Ambos fenómenos se acumulan. El primero es una acción limitada en el virus (ver *modelo 4*), el segundo más significativo (ver *modelo 2*) está al nivel de la célula.

La adición de las EI de los modelos 2 y 4 (2 minutos y 417 µg/L), es decir, 23 y 3, respectivamente, da una suma (26) menor pero cercana a la obtenida experimentalmente para el *modelo* 3, es decir, 35.

Se contempla una acumulación potencializada i) de reconocimiento deficiente de los compañeros y células de HSV y ii) una internalización y/ replicación inhibida, en particular mediante la alteración del metabolismo celular.

El *modelo* 1 (IE: 48 con 2 minutos de tiempo de contacto y 417 µg/L) es el que mejor funciona.

La acción de la mezcla 1 anti-infecciosa es preferible en la célula que en el virus. Esta acción es más efectiva ya que la célula está infectada previamente.

En este modelo que corresponde al mejor problema terapéutico, es obvio que la mezcla 1 tiene una eficacia farmacológica intracelular mayor específica. Para 417 µg/L de sustancia activa, la tabla 3 muestra que la cantidad de subunidades ribosómicas 18S es menor (dependiendo del control utilizado, 27 y 30%, pruebas 2 y 5) en este modelo que en el *modelo* 2 (según el control utilizado, 41 y 44%, pruebas 2 y 5) y en el modelo 3 (de acuerdo con el control utilizado, 70 y 58%, pruebas 2 y 5) que es un argumento para la especificidad de la célula infectada frente a la célula sana.

Los objetivos de la mezcla 1 en este modelo no pueden ser el reconocimiento o la internalización, sino modificaciones metabólicas. Estos últimos se encuentran en un nuevo equilibrio, especialmente debido al paso de radicales transmembranas, la modificación del potencial redox de la célula y la presencia de agentes quelantes externos, entre las vías de estrés oxidativo (ya inducidas por la infección), los flujos de calcio (ya inducido por la infección), la inhibición de la liberación dependiente de calcio de los viriones, las modificaciones por oxidación de proteínas directa o indirectamente involucradas en la replicación viral.

Ejemplo 7 - Evaluación ex vivo de la producción de interleucinas

Las biopsias no patológicas (8 biopsias y 4 donantes) de piel humana emitidas a partir de operaciones quirúrgicas para reducir el peso se trataron ex vivo con la mezcla 1 (5 mg/L de sustancia activa, 2 minutos). Los sobrenadantes en los que se encontraron las biopsias se muestrearon a las 6 h y 24 h después del contacto para cuantificar la inhibición de los interferones-α (IFN-α; inhibición de la infección con 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; inhibición de la replicación de HSV; 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) e interleucina 6 (IL-6; marcador de inflamación).

El control experimental positivo es un soluto fisiológico (NaCl 100 mM).

No se observó modificación alguna del nivel de base celular de IFN-α e IFN-β.

Dependiendo de las biopsias y de los donantes y en consecuencia del trauma de la operación quirúrgica y de la manipulación experimental:

A las 6 h después del contacto (figuras 6 y 7):

- con NaCl como control, producción de IL-6 basal de 277 pg/mL ± 11 a 2.866 pg/mL ± 206.

- con la mezcla 1, inhibición de la producción de IL-6 con respecto al control con NaCl, de 0 pg/ml a 1,015 pg/mL ± 17.

A las 24 horas después del contacto (figuras 6 y 7):

- con control de NaCl, producción de IL-6 basal de $1,485 \text{ pg/mL} \pm 37$ a $7,454 \text{ pg/mL} \pm 199$.
- con la mezcla 1, inhibición de la producción de IL-6 con relación al control con NaCl, de $84 \text{ pg/mL} \pm 15$ a $5,910 \text{ pg/mL} \pm 29$.

5 Conclusiones:

- heterogeneidad de producción y sobreproducción (6 h y 24 h, respectivamente) para el NaCl y la mezcla 1 después del contacto de IL-6 (figura 6).

- una inhibición heterogénea de la producción de IL-6 después del contacto con la mezcla 1 (5 mg/L de sustancia activa) que es en promedio 28% a las 6h y 19% a las 24h, con relación al control de NaCl (figura 6).

Por esta inhibición de la producción, la mezcla 1 tiene la propiedad de ser un antiinflamatorio (Figura 7).

Ejemplo 8 - Degradación del plasma y $\frac{1}{2}$ vida

Uno de los donantes de radicales (principalmente $\text{HO}_2^\cdot$, que tiene una vida de hasta unos pocos segundos y un índice de penetración celular notable) por una reacción del tipo Fenton-Haber-Weiss de la sustancia activa MoO_4^{2-} de la mezcla 1 es H_2O_2 . La degradación de este marcador se siguió para evaluar la velocidad de consumo de la mezcla 1 o su desactivación.

Técnica:

La mezcla 1 ($68.9 \text{ } \mu\text{M}$ o final $14.2 \text{ } \mu\text{g/L}$) se incubó en plasma humano fresco. La cinética de desaparición de H_2O_2 fue seguida por una reacción de peroxidasa en alícuotas muestreadas en ocasiones sucesivas.

Resultados:

- En promedio ($n = 10$), el porcentaje de degradación de la sustancia marcadora de la mezcla 1 en plasma humano a temperatura ambiente después de un tiempo de contacto de 2 minutos es de $85.3 \pm 9.4\%$, $74\% \pm 15.2\%$ en el primer minuto.

- En el primer minuto, el "Tiempo de degradación 50%" o $\text{DT}_{50} = 0.812$ minutos para una solución de mezcla 1 en una concentración inicial de $68.9 \text{ } \mu\text{M}$ de sustancia activa y 1mM inicial de H_2O_2 .

- La velocidad de degradación $K_{\text{CH}_2\text{O}_2} \approx 740 \text{ } \mu\text{moles}$ de la mezcla 1 a 1mM inicial de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/L}$ de plasma o $K_{\text{CMoO}_4^{2-}} \approx 51.0 \text{ } \mu\text{moles}$ de la mezcla 1 a $68.9 \text{ } \mu\text{M}$ iniciales de sustancia activa $\text{MoO}_4^{2-} / \text{min} / \text{L}$ de plasma, en el primer minuto de incubación a temperatura ambiente.

- Para una muestra de $200 \mu\text{L}$ de la mezcla 1 a $24.3 \text{ } \mu\text{M}$ (5.0 mg/L) de sustancia activa o 353 mM (12 g/L) del marcador H_2O_2 , dentro del alcance de una aplicación terapéutica tópica, hay $\approx 5 \text{ nmoles}$ de sustancia activa MoO_4^{2-} o $70 \text{ } \mu\text{moles}$ de H_2O_2 marcador. Esta muestra, en 1 litro de plasma, se degrada dentro de ≈ 0.1 minutos.

Ejemplo 9 - Hematotoxicidad limitada en sangre periférica

El objetivo de este estudio es evaluar la hematotoxicidad de la mezcla 1 ($24.3 \text{ } \mu\text{M}$ o 5.0 mg/L final) después de la incubación de 2, 3 y 5 minutos en sangre periférica humana. La toxicidad para la cual se evalúa la hemólisis sigue los principales parámetros sanguíneos, es decir, los recuentos de eritrocitos,

leucocitos, el hematocrito, de las plaquetas, el volumen promedio de glóbulos y el nivel de hemoglobina.

Conclusiones:

Los parámetros hematológicos relacionados con los recuentos de eritrocitos, leucocitos, el hematocrito, el volumen promedio de glóbulos y el nivel de hemoglobina no se modifican mediante una incubación de hasta 5 minutos con la mezcla de acuerdo con la invención.

El recuento de plaquetas se modifica por el contacto con la mezcla 1 desde -35% inmediatamente después de su adición, a -69% a los 5 minutos.

Ejemplo 10 - Paso transcutáneo limitado de la mezcla de acuerdo con la invención, absorción, biofase y biodisponibilidad (OCDE 428; EMEA, Human Guideline, 2001).

La mezcla 1 utilizada fue cinco veces más concentrada (Mezcla 1x5) para mostrar los pasajes más pequeños de las sustancias. El objetivo de este estudio fue evaluar (referencia t₀, t_{2min}, a t_{60min}) el paso de la mezcla 1x5 así como la del marcador H₂O₂ a través de biopsias de piel humana no patológicas.

Este protocolo se aplica a tres tipos de sustrato: biopsia total, biopsia disecada en la epidermis por un lado y en la dermis por otro lado.

Técnica:

Se analizaron 12 biopsias de 2 donantes (mediciones en la gota depositada en el colgajo [30μL]) y en el medio por debajo de este último [800μL] de acuerdo con los métodos (Tabla 4): i) quercetina que evalúa la eficiencia redox de la mezcla 1x5 y, ii) la peroxidasa que mide la concentración del marcador H₂O₂.

La gota (30 μL) depositada encima de las biopsias y los colgajos epidérmicos y dérmicos es 5 veces más concentrada en sustancia activa (121.5 μM o 25.02 mg/L) y en marcador (1.77 M o 60 g/L) que la formulación terapéutica (24.3 μM o 5.0 mg/L y 352.8 mM o 12 g/L, respectivamente). En los 30 μL del depósito de mezcla 1x5, hay 3.65 nmoles o 750 ng de sustancia activa y 53 μmoles o 1.8 mg de marcador.

Resultados:

Tabla 4

	Prueba	Ensayo	Biopsia*	Epidermis*	Dermis*
Caída	1	Eficiencia redox	-1.4 a -10.5	-5.7 a -23.9	NT
	2	Marcador H ₂ O ₂	-16.5 a -57.7	-72.5 a -99.9	-99.6
Medio	3	Eficiencia redox	+3.7 a +9.0	+0.8 a +80.6	+44.5 a +100
	4	Marcador H ₂ O ₂	< +0.001** a +0.09	+0.38 a +1.7	+0.16 a +0.46

* en % con respecto a t₀ (-: disminución, +: aumento)

** límite de detección.

Se observa una disminución de baja a moderada (prueba 1) de la eficiencia redox de la mezcla 1 en la caída sobre el colgajo (de -1.4 a -23.9%).

Se observa una disminución de moderada a significativa (prueba 2) de la cantidad de marcador H₂O₂ de la mezcla 1 en la gota sobre el colgajo (de -16.5 a -99.9%).

Se observa un aumento leve a significativo (prueba 3) de la eficacia redox del medio debajo del

colgajo. Depende del colgajo y de su tipo. Cuando se trata de una biopsia completa, este aumento debido al pasaje transcutáneo es bajo. En promedio es de 6.35% y corresponde al paso de 232 pmoles (47.6 ng) de sustancia activa de la mezcla 1. Cuando se trata de la epidermis o la dermis, este aumento es muy variable (de 0.8 a 100%). Esto es más probable debido a las diferencias en las estructuras histológicas (poros, irrigación sanguínea dérmica, terminaciones nerviosas epidérmicas, por ejemplo).

Se observa un aumento de no detectable a leve (prueba 4) de la cantidad de marcador H_2O_2 en el medio debajo del colgajo, independientemente de su tipo (de $<+0.001$ a 1.7%). Cuando se trata de una biopsia completa, este aumento debido al paso transcutáneo es particularmente bajo (<0.53 a 47.7 nmoles, es decir, <0.018 a 1.62 μg). Cuando se trata de la epidermis o la dermis, en promedio, este aumento es bajo (1.04 y 0.31%, es decir, 0.55 μmoles y 0.16 μmoles , o 18.7 μg y 5.6 μg , respectivamente).

Conclusiones:

Hay independencia del tejido (absorción, desactivación, permeación) de los dos parámetros considerados como típicos de la mezcla 1, que son la eficacia redox debido a la sustancia activa y la dosificación del marcador de peróxido, un donante de radicales.

Al considerar la biopsia total, el índice de penetración de la mezcla 1 corresponde al grosor del colgajo, es decir, 1 mm (grosor promedio de una epidermis) a 2 mm.

La epidermis contiene muchas terminaciones nerviosas que pueden ser el centro de precipitación salina axonal de viriones herpéticos en el paciente. Son los objetivos de la mezcla 1 de la misma manera que las células epidérmicas infectadas o antes de una posible infección. Al considerar la sucesión de ambos tejidos, la biofase de la mezcla 1 es casi estrictamente la del espesor de la epidermis (1 mm) y se alcanza en su totalidad para una absorción máxima del tejido blanco.

Al considerar que la dermis sola está vascularizada, a lo sumo 80.6% de la eficiencia redox de la mezcla 1 puede encontrarse nuevamente en su contacto y 1.7% del marcador. En estas condiciones experimentales, la biodisponibilidad de la mezcla 1x5 es de 2.94 nmoles o 605 ng de la sustancia activa y 0.9 μmoles o 30.6 μg de peróxido marcador.

En un estudio de genotoxicidad *in vitro*, con la prueba de Ames, la mezcla de acuerdo con la invención y sus metabolitos no es mutagénica en presencia del activador S9 (5/5 cepas de *Salmonella*), es mutagénica en 1/5 de la cepa en su ausencia.

En la aplicación local sobre la piel, estimulada o no, la mezcla de acuerdo con la invención (24.3 μM o 5.0 mg/L de sustancia activa) no tiene toxicidad alguna por irritación asociada.

En un estudio de irritación bucal y vaginal, la mezcla de acuerdo con la invención (24.3 μM o 5.0 mg/L) no es irritante (puntuación 0/16) y muy débil (puntuación 1/16), respectivamente.

En un estudio muy sensible de irritación de la membrana corioalantoidea de un huevo de gallina, la mezcla 1 (18.23 y 24.3 μM o 3.75 y 5.0 mg/L) es moderadamente irritante (Índice de irritación o IS = 6.8 $\pm$ 0.4 y 6.3 $\pm$ 0/21), respectivamente).

En un estudio de toxicidad aguda por aplicación dérmica, la mezcla de acuerdo con la invención en dosis de 25.0 y 31.3 $\mu\text{g/kg}$ de sustancia activa contenida en 60 y 75 mg/kg de marcador H_2O_2 , respectivamente, se tolera bien sin síntoma alguno, por una "dosis máxima tolerada" (DMT) y una "Dosis

máxima sin efecto perjudicial observable" (DMSEPO) o "Nivel de efecto adverso no observado" (NEANO) de 31.3 µg/kg de sustancia activa y 75 mg/kg de marcador.

En un estudio de toxicidad aguda con inyección intravenosa, la mezcla de acuerdo con la invención a las dosis de 10.4 y 12.5 µg/kg de sustancia activa contenida en 25 y 30 mg/kg de marcador H₂O₂, respectivamente, se tolera sin síntoma notable alguno de una "Dosis máxima tolerada" (DMT) de 12.5 µg/kg de sustancia activa.

Ejemplo 11 - Toxicidad aceptable de la mezcla de acuerdo con la invención

I - Mutagenicidad *in vitro* (prueba de Ames - OCDE 471)

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad mutagénica de la mezcla activa de acuerdo con la invención (Mezcla 1) y de sus metabolitos (producidos por la fracción S9 de un hígado de rata) sobre las cepas de *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA102 y TA1535.

Conclusiones:

- Sin sistema de activación S9, la mezcla activa (7.7 µM o 2.43 µM, es decir, 1.58 mg/L o 0.50 mg/L) de acuerdo con la invención y sus metabolitos no tienen efectos mutagénicos en las líneas TA97a, TA98, TA100 y TA1535.

- Con un sistema de activación S9, la mezcla activa (Mezcla 1x5: 121.5 µM o 25.02 mg/L) de acuerdo con la invención y sus metabolitos no tienen ningún efecto mutagénico sobre las líneas TA97a, TA98, TA100, TA102 y TA1535.

- Sin el sistema de activación S9, la mezcla activa de acuerdo con la invención no es mutagénica en la cepa TA102 a 0.50 mg/L.

En este ensayo *in vitro*, el efecto mutagénico de la mezcla activa y de sus metabolitos de acuerdo con la invención es limitado para sus usos (cepa TA102).

II - Sensibilización dermatológica después de la inducción (Hamster hembras, OCDE 406, ISO 10993-10: 2013 y Memorando de la ICH SCCP 2005)

De acuerdo con el protocolo de Magnusson y Kligman (*Magnusson B. y col. (1969) "The identification of contact allergens by animal assay", J. Invest. Dermatol., 52 (3), 268-276*), las potencialidades de sensibilización de la piel de las hembras de hámster se estudiaron de acuerdo con tres protocolos.

Protocolo 1: Determinación de la dosis límite tolerada

Las concentraciones de la mezcla 1 de 1.25 mg/L a 20.00 mg/L de sustancia activa contenida en 3g/L a 48 g/L de marcador H₂O₂, respectivamente, en un "parche" de 1 mL se aplicaron durante 24 horas en el flanco de los animales, y luego se observaron los animales.

La concentración de la mezcla 1 a 10 mg/L de sustancia activa contenida en 24 g/L del marcador es bien tolerada y causa irritación moderada.

La concentración de la mezcla 1 a 5.0 mg/L de sustancia activa contenida en 12 g/L de marcador H₂O₂ es bien tolerada y se considera como la dosis máxima no irritante.

Protocolo 2: Determinación de la dosis límite tolerada después de la inducción por inyección subcutánea.

Las concentraciones de 5 mg/L a 10 mg/L de sustancia activa contenida en 12 g/L a 24 g/L del marcador H₂O₂, respectivamente, de la mezcla 1 se inyectaron (100 µL) por vía subcutánea. A los 8 días (primer desafío), se logró una primera aplicación tópica como un “parche” de 1 mL. A los 27 días (segundo desafío), se logró una segunda aplicación tópica como un “parche” de 1 mL. Las observaciones se realizaron a los 29 días.

La concentración de la mezcla 1 a 5 mg/L de sustancia activa, contenida en 12 g/L del marcador, es bien tolerada y no produce irritación alguna.

Protocolo 3: Estudio de la irritación inducida por estimulación y aplicación tópica de la mezcla 1 a 5 mg/L de sustancia activa contenida en 12 g/L de marcador H₂O₂.

Se inyectaron 100 µL de mezcla 1 a 5.0 mg/L por vía subcutánea. A los 4 días, el área inyectada se estimuló con una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% antes de la aplicación tópica de la mezcla 1 (1 mL) en un “parche”. A los 6 días, se logró una segunda aplicación tópica. A los 21 días (desafío) se logró una aplicación tópica de la mezcla 1 (1 mL) en un “parche” con concentraciones de 6.26 a 10 mg/L de sustancia activa contenida en 15 a 24 g/L de marcador.

La mezcla 1 a 5.0 mg/L de sustancia activa contenida en 12 g/L de marcador es bien tolerada y la puntuación de sensibilización cutánea por la formulación es igual a 0/3.

Conclusiones: La mezcla 1 a 5.0 mg/L de sustancia activa no es irritante. No se observó alteración macroscópica de la piel de los animales. En consecuencia, no hay necesidad de ningún estudio anatomopatológico.

III - Irritación bucal y vaginal (conejo hembra, OCDE (99) 20, -21, -23 -24, - (95)115, - (02) 9 e ISO-10993-10: 2013)

El objetivo de este estudio fue evaluar la tolerancia vaginal y bucal de la mezcla 1 a 5.0 mg/L de sustancia activa contenida en 12 g/L de marcador de acuerdo con una exposición que cumpla con un uso terapéutico humano de 5 días.

Desde el día 0 hasta el día 6, cada 24 h, los animales son tratados (1 mL) por vía bucal y vaginal. En el día 7, se observan los animales y se mide su peso.

Conclusiones: la concentración de la mezcla 1 a 5.0 mg/L de sustancia activa es bien tolerada. El índice de irritación bucal y vaginal es 0/16 y 1/16, respectivamente. En consecuencia, no hay necesidad de un estudio anatomopatológico.

IV - Prueba de irritación ocular (aplicación B de ICCVAM)

La prueba de irritación ocular utilizada fue la prueba de sustitución HET-CAM (Prueba del huevo de gallina - Membrana corioalantoidea), publicada en el Diario Oficial del 26/12/1996. Es recomendado por ICCVAM.

Aunque este método particularmente sensible no está oficialmente validado por la U. E., se acepta su uso para localizar las sustancias incluso ligeramente irritantes, incluidas las que serían irritantes oculares para asignarles la etiqueta R41 (2002).

Brevemente, el método consiste en aplicar una sustancia de prueba de la mezcla 1 a 3.75 y 5.00 mg/L de una sustancia activa en 9 y 12 g/L de marcador, respectivamente, sobre la membrana

corioalantoidea de un huevo de gallina fertilizado. A los 0.5, 2 y 5 minutos después del contacto, se observan los tres criterios siguientes: hemorragia, coagulación e hiperemia.

Resultados y conclusiones:

La mezcla 1 a 3.75 mg/L o 5.00 mg/L de sustancia activa puede clasificarse como moderadamente irritante (Índice de irritación o IS = 6.8 ± 0.4 y $6.3 \pm 0/21$, respectivamente), es decir, induce una ligera lisis (puntuación de gravedad = 1/3) inmediatamente después de su introducción o a los 30 s después del contacto, sin hemorragia ni coagulación.

Teniendo en cuenta el valor Q (relación de los índices entre los de las sustancias positivas de referencia NaOH 0.1M [IS = 15 ± 3] y 1% SDS [10 ± 2] vs. mezcla 1), Q vs. NaOH = 0.51 a 0.54 y Q frente a SDS = 1.10 a 1.18 para la mezcla 1 a 3.75 y 5.00 mg/L de sustancia activa, respectivamente.

Por consiguiente, con respecto a esta prueba de sensibilidad extrema, que es mucho más significativa que la prueba de irritación vaginal que ya tiene un alto rendimiento en conejos hembras, la mezcla 1 se considera una sustancia de ligeramente (3.75 mg/L) a moderadamente (5.00 mg/L) irritante.

V - Estudio de toxicidad aguda por aplicación cutánea e inyección intravenosa - Dosis máximas toleradas (DMT) y dosis sin efecto tóxico observable (NOAEL) (rata, OCDE 474, ICH M3(R2) y S6(R1))

El objetivo de este estudio es determinar la dosis máxima tolerada (DMT) de la mezcla 1 por aplicación cutánea (1 mL) o por inyección intra-caudal (5 mL/kg). Las observaciones clínicas se reportaron hasta el día 14.

Conclusiones del protocolo de aplicación cutánea:

La mezcla 1 tiene una dosis de 50 µg/kg de sustancia activa (1 mL a 10 mg/L) que es bien tolerada. Se observa un ligero eritema del área tratada y la aparición de pequeñas costras que desaparecen en 2 días. No se observa irritación.

Se observan los mismos síntomas proporcionalmente más leves para una aplicación de la mezcla 1 de 37.5 µg/kg de sustancia activa (1 mL a 7.5 mg/L).

La mezcla 1 en dosis de 25.0 y 31.3 µg/kg de sustancia activa (1 mL a 5.0 y 6.26 mg/L) es bien tolerada. No se observan síntomas cutáneos, metabólicos o fisiológicos en D14.

La DMT de la mezcla 1 en una aplicación cutánea en rata es de 31.3 µg/kg de sustancia activa (1 mL a 6.26 mg/L).

La NOAEL (dosis sin efecto tóxico observable) de la mezcla 1 en la aplicación cutánea en ratas es de 31.3 µg/kg de sustancia activa (1 mL a 6.26 mg/L).

Conclusiones del protocolo de inyección intra-caudal:

La dificultad de la administración intravenosa de la mezcla 1 no radica en una toxicidad intrínseca de la invención, sino en su descomposición en contacto con la sangre que genera en particular oxígeno molecular que puede ser responsable de la embolia. La dosis límite ética (3 ratas) que ha demostrado una detención respiratoria reversible es de 14.6 µg/kg de sustancia activa (5 mL/kg de la mezcla 1 a 2.92 mg/L). No se registró signo de toxicidad alguno hasta D14.

La mezcla 1 se tolera después de la inyección intravenosa a 12.5 µg/kg de sustancia activa (5

mL/kg de la mezcla 1 a 2.5 mg/L). Se observaron dificultades fisiológicas (movimientos y dificultades respiratorias) en animales en el momento de la inyección. No se registró signo de toxicidad alguno hasta D14.

Los mismos síntomas proporcionalmente menos significativos se observaron después de una inyección intravenosa a 10.4 µg/kg de sustancia activa (5 mL/kg de la mezcla 1 a 2.1 mg/L). No se reportó signo clínico o modificación alguna de la curva de peso. No se registró ningún signo de toxicidad alguna hasta D14. La observación macroscópica de los órganos en D14 después de la autopsia no reveló nada.

La DMT de la mezcla 1 en una inyección intra-caudal es de 12.5 µg/kg de sustancia activa (5 mL/kg de la mezcla 1 a 2.5 mg/L).

VI - Estudio de la genotoxicidad *in vivo* mediante la búsqueda de generación de micronúcleos después de la inyección intravenosa de la mezcla 1 (Machos y hembras de rata, OCDE 474 e ICH S2(R1))

Se inyectaron hembras de rata (n = 5) y machos (n = 5) (dos tratamientos en un intervalo de 22-26 horas; 5 mL/kg) con agua HPLC como vehículo (vía intravenosa), los controles positivos de ciclofosfamida a 5 y 10 mg/kg, vía intravenosa y metanosulfonato de etilo a 100 y 150 mg/kg (vía intraperitoneal) y la mezcla 1 a 1.46, 4.17 y 12.5 µg/kg de sustancia activa (vía intravenosa).

Se observó la morbilidad, la mortalidad, el peso de los animales y los parámetros clínicos (temperatura, piel, cabello, ojos, membranas mucosas, secreciones y excreciones, función respiratoria y neurológica, marcha y postura). 36 h a 48 h después del segundo tratamiento, la sangre de los animales se recogió y se analizó en citometría de flujo (control de toxicidad: reducción de la proporción de eritrocitos inmaduros (CD-71-positivo). La proporción de eritrocitos inmaduros micro-nucleados (reticulocitos) se evaluó en 4,000 observaciones por muestra de sangre. Cada población de ratas (n = 10) para cada sustancia evaluada representa 40,000 observaciones (Tabla 5).

Tabla 5:

Sustancia	mg/kg	género	n	Reticulocitos (%)	Reticulocitos micro nucleados (%)
Antes del tratamiento	#	macho	5	4.39±0.92	0.15±0.09
		hembra	5	2.60±0.57	0.17±0.07
Control negativo Agua	#	macho	5	5.17±1.47	0.32±0.31
		hembra	5	3.82±0.29	0.12±0.04
Control positivo 1 Ciclofosfamida	5	macho	5	3.99±0.49	0.56±0.17
		hembra	5	2.41±0.54	0.40±0.13
	10	macho	5	1.95±0.59	1.62±0.29
		hembra	5	1.30±0.43	1.02±0.26**
Control positivo 2 Metanosulfonato	100	macho	5	1.41±0.32	0.68±0.35**
		hembra	5	1.86±0.25	0.48±0.16**
	150	macho	5	1.33±0.34	0.81±0.48**
		hembra	5	0.45±0.33	0.59±0.26**
Mezcla 1	1.46 .10 ⁻³ #	macho	5	5.32±0.76	0.10±0.02
		hembra	5	3.35±0.46	0.09±0.03
	4.17 .10 ⁻³ #	macho	5	4.82±0.41	0.11±0.03
		hembra	5	3.35±0.83	0.09±0.02
	12.5 .10 ⁻³ #	macho	5 - 3*	4.79±0.16	0.22±0.12
		hembra	5 - 1*	3.40±0.19	0.09±0.02

* animales muertos durante el primer tratamiento por embolia debido a la liberación de oxígeno molecular de la mezcla 1 en contacto con la sangre.

** estadísticamente diferente del grupo de control.

en sustancia activa MoO_4^{2-} .

5 **Conclusión:** en comparación con los grupos controlados (positivo y negativo), la mezcla 1 no tiene genotoxicidad alguna al inducir la producción de reticulocitos micro nucleados después de la inyección intravenosa en ratas ($n = 10$, incluidos 5 machos y 5 hembras) con un rango de 1.46, 4.17 y 12.5 $\mu\text{g/kg}$ de sustancia activa.

Ejemplo 12 - Comparación con otras composiciones

10 El presente ejemplo muestra notablemente la influencia de la composición, en particular del potencial redox en:

1 - el papel del calcio en la catálisis “similar” a la de Fenton/Haber-Weiss de las formulaciones evaluada.

2 - la existencia de una diferencia entre tres formulaciones de 5.0 mg/L de sustancia activa.

15 S1: Mezcla 1,

S2: composición de acuerdo con US 6,660,289,

S3: composición de acuerdo con WO/2010/004161.

Protocolo 1 (Tablas 6 y 7):

- 2 parámetros medidos: i) pH, ii) potencial redox.

20 - catalizador CaCl_2 (1M, en H_2O): adición en una concentración final de 24 mM

- cinética: inicial (T_0), 1, 2, 3 minutos (T_1 , T_2 , T_3) después de agregar CaCl_2 con agitación.

Resultados y discusión:

Tabla 6

25	Solución S1		T_0	CaCl_2 24mM	T_1	T_2	T_3	Promedio (entre T_1 y T_3)	Δ / T_0
	pH		4.70	↓ a T_0	4.58	4.59	4.59	4.59 durante 3 min.	-0.11
	Pot. de redox E° (mV)		359		383	383	383	383 durante 3 min.	+24
30	Solución S2		T_0	CaCl_2 24mM	T_1	T_2	T_3	Promedio (entre T_1 y T_3)	Δ / T_0
	pH		2.85	↓ a T_0	2.65	2.65	2.66	2.65 durante 3 min	-0.20
	Pot. de redox E° (mV)		437		479	475	474	476 durante 3 min	+39
	Solución S3		T_0	CaCl_2 24mM	T_1	T_2	T_3	Promedio (entre T_1 y T_3)	Δ / T_0
	pH		3.01	↓ a T_0	2.86	2.87	2.87	2.87 durante 3 min.	-0.14
	Pot. de redox E° (mV)		414		465	464	464	464 durante 3 min	+50

35 El pH de la piel es de 4.93 +/- 0.45 a 5.12 +/-0.56. El pH vaginal es normalmente del orden de 4.50 y puede llegar hasta 6.00 en la menopausia.

- la solución S1 está tamponada y a un pH del orden de la de la piel humana y las membranas mucosas. Este pH permanece relativamente constante hasta 3 minutos de contacto después de añadir CaCl_2 24 mM final. Se observa un aumento moderado de E° que puede provenir en parte de la adición del

cloro de CaCl_2 .

- Un pH ácido amplifica la peroxidación lipídica citotóxica mediada por hierro.

La solución S2 no está tamponada. Su pH no es muy compatible para el contacto con la piel o las mucosas (incluida la probable destrucción de la flora comensal en un uso terapéutico). Este pH permanece relativamente constante hasta 3 minutos de contacto después de agregar CaCl_2 a los 24 mM finales. Se observa un aumento al menos moderado frente a S1 de E° que puede provenir en parte de la adición de cloro de CaCl_2 .

La solución S3 no está tamponada. Su pH no es muy compatible para el contacto con la piel o las membranas mucosas (incluida la probable destrucción de la flora comensal en un uso terapéutico). Este pH permanece relativamente constante hasta 3 minutos de contacto después de añadir CaCl_2 24 mM final. Se observa un aumento significativo (+50 mV) de E° que puede provenir en parte de la adición del cloro de CaCl_2 , pero con respecto a la diferencia en el aumento potencial frente a S1 y S2, probablemente no existiría este factor único.

Con respecto a los iones Fe *in situ*, a un pH ácido (<2.33), el potencial redox es del orden de 400 mV y el hierro en la forma (III), es decir, en su forma más citotóxica. A un pH del orden de 4.5, el potencial redox es del orden de 300 mV, el hierro hemoglobínico en la forma (II) y el hierro plasmático complejoado con transferrina en la forma (III).

Al pH de las soluciones S2 y S3, el óxido de hierro $\text{Fe}(\text{OH})_3$ está muy desfavorecido. En consecuencia, las reacciones de Fenton-Haber-Weiss no son muy efectivas.

El valor del potencial del par $\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}$ (tipo Fenton) es: $E^\circ = 1.19 - 0.18 \times \text{pH}$.

Tabla 7

	Sust. activa (mg/L)	pH	$E^\circ_{\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}} \text{ (mV)}^*$	$E^\circ_{\text{solución}} \text{ (mV)}$
S1	5.0	4.70	344	354
S2	5.0	2.80	686	428
S3	5.0	3.00	650	418

* nivel celular *in situ* con hierro

De acuerdo con este estudio, hay confirmación de que el par $\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}$ está en desventaja. Incluso si mejora el potencial redox de este par (418-428 mV), sigue siendo demasiado significativo para el contacto celular.

- el potencial transmembranal de una célula animal es negativo ($\approx -70\text{mV}$). Cuanto más significativo es el potencial de oxidación-reducción de la solución, mayor será la alteración del potencial transmembranal y mayor será la inducción del estrés oxidativo celular (inducción génica de la apoptosis, de las vías eNOS...) con inducción concomitante de una afluencia de calcio que potencializa el estrés celular significativo inducido previamente por las soluciones 2 y 3.

Por consiguiente, el pH y el potencial redox de la formulación S2 y especialmente el potencial redox de la formulación S3 son muy probablemente citotóxicos. Ambas soluciones S2 y S3 no pueden ser adecuadas para uso terapéutico.

Protocolo 2 (Tabla 8):

Las concentraciones celulares y plasmáticas del calcio son del orden de 2 a 3 mM. Este protocolo se basa en un uso terapéutico de las formulaciones.

- 1 parámetro medido: cantidad residual de peróxidos (H_2O_2 , ácido peracético, rango de prueba

5 Quantofix entre 0 y 25 mg/L).

- catalizador CaCl_2 (1M, en H_2O): adición en una concentración final de 1.25, 2.5, 10, 25 y 50 mM.

- volumen final: 1 mL = 0.950 μL de solución evaluada + 0.05 μL de la dilución de CaCl_2 . El factor de dilución de la solución evaluada: 1.05. Concentración final de la solución ensayada 11.4 g/L (12 g/L inicial) del marcador H_2O_2 que contiene 4.76 mg/L de sustancia activa (inicial 5.00 mg/L).

10 - cinética: 5 minutos después de agregar CaCl_2 con agitación.

Resultados:

Tabla 8

Prueba	Solución evaluada	$[\text{CaCl}_2]$ (mM) final	$[\text{peróxidos}]_{\text{final}}$ (mg/L)
1	S1	50	>>25
2	S1	25	10-25
3	S1	10	10
4	S1	2.5	5-10
5	S1	1.25	$\approx$ 25
6	S2	2.5	>25
7	S3	2.5	>25
8	S3	1.25	$\approx$ 25

La desactivación de la formulación S1 a los 5 minutos de contacto con CaCl_2 2.5mM (concentración fisiológica) corresponde a un descenso de peróxido en un factor de 1,500 (Prueba 4), es decir, de 12 g/L a 8 mg/L de marcador y de 5.00 mg/L a 3.33 $\mu\text{g/L}$ de sustancia activa).

Conclusiones comparativas sobre las formulaciones S2 y S3

25 La solución S2, independientemente del metal utilizado, no es compatible con una aplicación terapéutica, por:

- su pH no tamponable para conservar sus potencialidades,
- su potencial redox citotóxico,
- su independencia relativa a la catálisis del calcio,

30 - su citotoxicidad en condiciones fisiológicas debidas al H_2O_2 y al ácido peracético (además de la presencia de iones Ag^+ , por ejemplo, con citotoxicidad irreversible),

- en las condiciones experimentales utilizadas, no existe catálisis de Fenton-Haber-Weiss, por lo que no existe producción radical reactiva para uso terapéutico.

La solución S3, independientemente del metal utilizado y el par quelante descrito en la solicitud de

35 patente WO2010/004161, no es compatible con una aplicación terapéutica, por:

- su pH que no es compatible con BAPTA,
- su potencial redox citotóxico,
- su independencia relativa a la catálisis del calcio,

- su citotoxicidad en condiciones fisiológicas debidas al H_2O_2 y al ácido peracético,
 - en las condiciones experimentales utilizadas, no existe catálisis similar a la de Fenton-Haber-Weiss, por lo que no existe una producción de reactivos radicales para uso terapéutico.

Por el contrario, el modelo químico de reacción de la formulación S1 de acuerdo con la invención es correcto debido a su desestabilización por el calcio.

Para la formulación S1, las selecciones:

- del pH,
 - del par tamponador (adición de un solo elemento del par: ácido acético, ya que el ácido peracético se produce ligeramente *in situ*),

- del metal de transición y de sus valencias compatibles con las reacciones similares de Fenton-Haber-Weiss o no,

- del par de agentes quelantes (compatibilidad entre ellos con $K_{dCa^{2+}}$ y K_{dMo} , $K_{dFe^{2+}/Fe^{3+}}$ en "cascada"),

- la penetración no celular de los agentes quelantes,

- de la activación del complejo de la solución S1 por calcio u otros iones metálicos existentes *in situ*, a dosis fisiológicas y pH (importancia de la selección de los agentes quelantes), a un potencial redox que limita notablemente las oxidaciones lipídicas (poca producción de $Fe(III)$) y la generación instantánea de radicales reactivos permeables a corto plazo, sin acumulación, hacen que esta formulación sea compatible con el uso terapéutico.

La solución S1 se degrada fuertemente a concentraciones fisiológicas de calcio con un mínimo de 2.5 mM. Una reducción (1.25mM) o un aumento (de 10 a 50mM) de esta concentración no fisiológica de calcio altera fuertemente esta degradación de los peróxidos debido a las reacciones similares a Fenton-Haber-Weiss por desplazamiento de los equilibrios (ley de acción masiva). El complejo químico correspondiente a la solución S1 está totalmente adaptado a una reacción específica en la constante cálcica celular y plasmática.

Ejemplo 13 - Ejemplo de una mezcla activa de acuerdo con la invención con una combinación de Mo y La

Este ejemplo de composición ("Mezcla 2") de acuerdo con esta invención se prepara con una sal de molibdeno y una sal de lantano. Se prepara una composición de la fórmula de acuerdo con la Tabla 9, expresada como la concentración inicial de los componentes:

Tabla 9

Sustancias	Mezcla de la invención
Molibdato de sodio	20.7 μ M
Nitrato de lantano	11.5 μ M
BAPTA	42 μ M
EGTA	1051.6 μ M
H_2O_2	353mM
CH_3COOH/CH_3COONa	70mM
pH (por NaOH)	4.4 – 5.0
E°_{redox}	300 a 420mV

La composición se denomina “inicial” porque corresponde a las concentraciones de los reactivos agregados sin tener en cuenta el proceso catalítico utilizado.

Todas las sustancias utilizadas en la síntesis y el producto final están validadas por el espectro IR-FT.

Tabla 10

Producto	Pureza	Fórmula molecular	N° CAS
Molibdato de sodio dihidratado	98-103%	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10102-40-6
Nitrato de lantano hexahidratado	$\geq 99\%$	$\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10277-43-7
BAPTA : (ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético)	$\geq 98\%$	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	85233-19-8
EGTA: (ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético)	$\geq 99\%$	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	67-42-5
Peróxido de hidrógeno	29-31%	H_2O_2	722-84-1
Ácido acético glacial*	99.8-100.5%	CH_3COOH	64-19-7
Acetato de sodio trihidratado	99-101%	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5010524
Hidróxido de sodio	10N	NaOH	1310-73-2
Agua desmineralizada	1 μS	H_2O	7732-18-5

La sustancia activa es: $\text{La}(\text{MoO}_4)^{1-}$, Na^+ (hidro-peroxomolibdato de lantano).

Peso molecular: 481.81 g/mol.

Proceso de fabricación:

El proceso de fabricación es idéntico al de la mezcla 1 en el Ejemplo 1, con la excepción de las modificaciones que se describen a continuación:

- Se están preparando dos soluciones SC:

Solución A - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (fuente de Mo(VI); 100%) 200 mg (2.4 mM final)

Agua c.b.p. 340mL

Agitación suave, temperatura ambiente

Solución B - $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (fuente de La(III); 100%) 200 mg (1.4 mM final)

Agua c.b.p. 340mL

Agitación suave, temperatura ambiente

- La solución A (10 mL) y luego la solución B (10 mL) se introducen gradualmente en la solución de Si2 para preparar una solución S1 de hidro-peroxomolibdato de lantano
- ETAPA (vii): Agregar agentes quelantes - Preparación de una solución S4

Introducción BAPTA (98.8%)	20 mg/L,
Introducción EGTA (99.1%)	400 mg/L
- El pH de la solución final se ajusta con NaOH a 4.67
- E_{redox} final es: 380 mV.

En la Mezcla 2, la concentración final de $\text{La}(\text{MoO}_4)^{1-}$, Na^+ es: 20.8 μM .

Ejemplo 14 - Evaluación de la eficacia oxido-reductora de la invención en molibdato doble complejo y lantano en plasma humano

Con el fin de comparar la eficacia oxidativa de las formulaciones a base de $(\text{MoO}_4)^{2-}$ (Mezcla 1) y a base de $\text{La}(\text{MoO}_4)^{1-}$ (Mezcla 2), formulaciones con concentraciones comparables a las descritas en la figura 3 e inferiores a las descritas en la figura 5 se pusieron en contacto con plasma humano durante 2 min. Después de la extracción de las muestras experimentales, específicamente en esta zona de concentración, las mezclas 1 y 2 de acuerdo con la invención generan un aumento en la producción *in situ* de quercetina oxidada. Las concentraciones finales de MoO_4^{2-} y $\text{La}(\text{MoO}_4)^{1-}$ ensayadas fueron entonces: 0.00, 3.80, 7.59, 1215 nM y 0.00, 3.25, 6.50, 1,040 nM, respectivamente (figura 8).

La diferencia en la producción de quercetina oxidada (ápice de alrededor de 295 nm) entre las dos formulaciones (Mezcla 1 y Mezcla 2) no es significativa. La eficacia oxido-reductora entre las dos composiciones de acuerdo con la invención es comparable.