



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0034115

(51)⁸ A61K 9/08; A61K 33/40; C11D 3/48;
A61P 31/12; A61P 31/22; A61K 33/24

(13) B

(21) 1-2018-04688

(22) 29/03/2017

(86) PCT/IB2017/051797 29/03/2017

(87) WO 2017/168344 05/10/2017

(30) 1652697 29/03/2016 FR

(45) 25/11/2022 416

(43) 25/06/2019 375A

(73) OXYMO TECHNOLOGIES INC. (CA)

730 rue Delage, Longueuil, Québec J4G 2V8, Canada

(72) WILMOTTE, Rémi (FR); LORENZO, Frédéric (FR); CHRETIEN, Denis Olivier (FR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHẾ PHẨM VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PEROXOMETALAT, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ NÓ

(57) Sáng chế đề cập đến hỗn hợp hoặc chế phẩm, tốt hơn là có hoạt tính điều trị bệnh qua đường khu trú, chứa:

- ít nhất một muối kim loại, kim loại này được chọn từ nhóm bao gồm molybden (Mo), vonfram (W), vanadi (V), vàng (Au), dãy lantanoid, cụ thể là lantan;

- ít nhất một chất cang hóa;

- ít nhất một nguồn chứa gốc peroxit hóa;

- ít nhất một chất đệm;

cũng như dược phẩm bào chế được bởi hỗn hợp này hoặc chứa hỗn hợp này, phương pháp sản xuất hỗn hợp này và sử dụng nó, cụ thể là để dùng trong phương pháp điều trị bệnh nhiễm virus, và cụ thể là kể cả virus thuộc họ *Herpesviridae*; hoặc điều trị bệnh kháng viêm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hỗn hợp có hoạt tính dùng trong điều trị bệnh, hỗn hợp này chứa peroxometalat, ví dụ, như peroxomolybdat và/hoặc, ví dụ, như peroxolanthanat.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến hỗn hợp có hoạt tính dùng để phòng và chữa bệnh nhiễm *Herpesviridae* và cụ thể là, bệnh nhiễm ecpet *Herpes simplex 1* (HSV-1 hoặc HHV-1) và *Herpes simplex 2* (HSV-2 hoặc HHV-2). Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa hỗn hợp có hoạt tính này, phương pháp bào chế cũng như ứng dụng nó, cụ thể là trong lĩnh vực điều trị bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong số các nguồn lây nhiễm bệnh, ngoài mức độ trầm trọng dễ thay đổi theo kiểu của chúng, các bệnh do virus gây ra có thể khiến cho bệnh nhân tử vong, và có tỷ lệ bệnh tật rất thất thường tùy thuộc vào quần thể và thời gian, hiện là vấn đề nghiêm trọng trong điều trị bệnh. Tác nhân gây bệnh này cần sử dụng quá trình chuyển hóa và các thành phần của tế bào vật chủ nhân lên, do đó rất khó điều trị tích cực triệt để mô khỏe mạnh liên quan tới mô đã nhiễm virus, hoặc ngay cả khi điều trị để phòng bệnh.

Trong số các bệnh nhiễm virus có thể ảnh hưởng tới con người, bệnh nhiễm *Herpesviridae* là bệnh dịch địa phương phổ biến, có khả năng lây nhiễm cao. Họ virus này chứa ADN cấu thành bởi tám loại virus. Trong số đó, HHV-1 hoặc HSV-1 và HHV-2 hoặc HSV-2 liên quan tới bệnh nhiễm ecpet ở khoang miệng-môi và âm đạo-hậu môn.

Toàn bộ virus ecpet đều có đặc tính về cấu trúc protein và bộ gen trên lâm sàng như tính tiềm tàng, khả năng tái phát hoặc khả năng hoạt hóa quá trình phân giải.

Tương tự như đối với toàn bộ các bệnh nhiễm virus, các phương pháp trị liệu là phức tạp và thường gặp nhiều hạn chế. Sáng chế sẽ giải quyết được vấn đề kỹ thuật này bao gồm việc tạo ra được phẩm có tác dụng trị bệnh nhiễm virus, cụ thể là bệnh nhiễm virus kể cả *Herpesviridae* và cụ thể là HSV-1 và HSV-2.

Bệnh nhiễm HSV-1 và HSV-2 là bệnh truyền nhiễm rất nhanh (chủ yếu là do tiếp xúc) và là bệnh dịch địa phương (Tổ chức Y tế thế giới - World Health Organization (WHO), January 2016, "*The virus herpes*", bản ghi số 400, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/fr/#>). Nguồn lây bệnh là người, mà không phải bệnh lây từ động vật sang người bất kỳ hoặc vật truyền bất kỳ. Tỷ lệ mắc bệnh do nhiễm HSV-1 liên quan tới bệnh nhiễm ecpet ở khoang miệng-môi, một số dạng của bệnh ecpet ở bộ phận sinh dục và bệnh viêm mé mống do ecpet gây ra, thay đổi tùy thuộc vào các lực địa, phương pháp và khả năng chẩn đoán bệnh. Ước tính nó chiếm trung bình khoảng từ 84% đến 99% ca ở châu Phi, từ 50% đến 100% ca ở châu Á, từ 65% đến 98% ca ở châu Âu và từ 57% đến 68% ca ở Bắc Mỹ mắc bệnh. Tỷ lệ mắc bệnh do nhiễm HSV-2, liên quan tới bệnh ecpet ở bộ phận sinh dục và hậu môn, thay đổi tùy thuộc vào giới tính, thành phần xã hội học và dân tộc, độ tuổi và lực địa. Ví dụ (theo: Trung tâm kiểm soát và phòng bệnh (Centers for Disease Control and Prevention - CDC), 2010, MMWR Morb Mortal Wkly Rep., 59(15):456-459), ước tính tỷ lệ dương tính huyết thanh ở Mỹ trong độ tuổi từ 40 đến 49 là 32% ở nữ giới và 20% ở nam giới.

Xét về tỷ lệ bệnh tật, có thể thấy rằng bệnh nhiễm HSV-1 và HSV-2 gây ảnh hưởng nhất định trên toàn thế giới. Thực vậy, hiện chưa có phương pháp điều trị bệnh nào cho hiệu quả hoàn toàn triệt để, xét về việc dùng thuốc kháng virus qua đường miệng hay ngoài đường tiêu hóa, cho dù đó là chất tương tự của pyrophosphat (foscarnet chẳng hạn), chất tương tự của nucleosit không có hoạt tính hay có hoạt tính tại chỗ (tương tự fialitabin, vidarabin, aciclovir và tiền dược chất của nó valaciclovir chẳng hạn) hoặc của chất ức chế phức hợp enzym helicaza-primaza (pritelivir). Các thuốc đã nêu góp phần vào việc làm giảm mức độ trầm trọng và tần suất xuất hiện của các triệu chứng nhưng không điều trị triệt để được bệnh nhiễm virus này. Phổ biến nhất, do độ hòa tan kém của các phân tử này và cụ thể là các hợp chất của họ

« ciclovir » (1,3 mg/mL trong nước ở 25°C đối với aciclovir) cũng như mức độ hấp thu giới hạn trong ruột của chúng (khoảng 20% đối với aciclovir khi dùng qua đường miệng), nên cần dùng liều liên tiếp cho bệnh nhân.

Không giống như thuốc dùng khu trú cho mắt, các chất kháng HSV được sử dụng ngoài da (như ciclofovir, ibacitabin, aciclovir chẳng hạn) có hiệu quả lâm sàng ở mức vừa phải và không ổn định.

Hơn nữa, đã xuất hiện các dạng kháng virus *Herpes simplex* trong điều trị bệnh thông thường qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Chúng chủ yếu liên quan tới các đột biến bộ gen của virus (Bacon T.H. *et al*, 2003, Clin. Microbiol. Rev., 16(1), 114-128; Biswas S. *et al*, 2008, Antiviral Res., 80(1), 81-85).

Ngoài mức độ lây nhiễm, chứng đau và diện mạo khó coi tái diễn theo định kỳ của bệnh nhân trong quá trình tái hoạt hóa virus, các bệnh nhiễm virus này có thể trở nên phức tạp do bệnh lý trầm trọng và phức tạp cho dù còn khá hiếm gặp, như bệnh viêm não hoặc bệnh viêm giác mạc do ecpet gây ra. Sự lây nhiễm từ người mẹ của trẻ mới sinh có thể gây chết 60% nếu không được điều trị. Bệnh nhiễm virus ecpet và sự phát triển của chúng có thể liên quan tới các nguồn lây bệnh khác do yếu tố kìm hãm miễn dịch (cảm ứng hoặc bệnh lý) hoặc sự kìm hãm miễn dịch của bệnh nhân như, ví dụ, trong trường hợp các bệnh ung thư nhất định hoặc sau khi cấy ghép. Bệnh nhiễm HSV-2 là một trong số các bệnh nhiễm virus thường gặp nhất (chiếm 60% đến 90%) trong số những người mang virus HIV. Nguy cơ nhiễm HIV mới sẽ nhân lên gấp ba khi đã nhiễm HSV-2. Người mang mầm bệnh của hai bệnh nhiễm virus này sẽ có nguy cơ lây truyền HIV cao hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế là nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất phương pháp bào chế được phẩm như vậy.

Mục đích của sáng chế cũng nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm mà có thể được chấp nhận để dùng khu trú.

Mục đích của sáng chế cũng nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm dễ hòa tan trong các dung môi ưa nước.

Mục đích của sáng chế còn nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm mà có hoạt tính trong quá trình đi qua biểu bì.

Mục đích của sáng chế còn nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm mà được khử hoạt tính trong quá trình đi qua da.

Mục đích của sáng chế còn nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm, pha sinh học của chúng được phân cách và thu được.

Mục đích của sáng chế còn nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm mà sự sinh khả dụng của chúng đạt được tối thiểu.

Mục đích của sáng chế còn nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm mà có tác dụng chống sự sao chép của virus, và cụ thể là HSV.

Mục đích của sáng chế còn nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm mà có độc tính tế bào cao đối với các tế bào đã nhiễm virus, và cụ thể là HSV.

Mục đích của sáng chế còn nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm mà có độc tính tế bào rất nhỏ đối với các tế bào khỏe mạnh.

Mục đích của sáng chế còn nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm mà có hiệu quả phòng bệnh và cụ thể là đối với HSV.

Mục đích của sáng chế còn nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm mà có hiệu quả phòng bệnh, đặc biệt là trong pha báo trước của bệnh nhiễm virus và cụ thể là virus HSV.

Mục đích của sáng chế còn nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm mà có hiệu quả phòng bệnh đặc biệt là bằng cách rút ngắn pha cấp tính và cụ thể là đối với HSV.

Mục đích của sáng chế còn nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm mà có thể ngăn ngừa hoặc hạn chế được quá trình nhiễm virus và cụ thể là đối với quá trình nhiễm virus HSV.

Mục đích của sáng chế còn nhằm giải quyết vấn đề kỹ thuật bao gồm việc đề xuất được phẩm mà có độ ổn định tốt trong quá trình bảo quản ở nhiệt độ trong phòng và nhiệt độ tối đa là 45°C.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện sự thay đổi của thế oxy hóa khử và nồng độ H_2O_2 trong quá trình điều chế hỗn hợp 1.

Fig. 2 minh họa toán đồ Fe^{3+} được sử dụng để thử nghiệm hiệu quả oxy hóa khử của hỗn hợp 1.

Fig. 3 minh họa hiệu quả oxy hóa khử của hỗn hợp 1 ở các nồng độ khác nhau của nó (độ hấp thụ quercetin bởi $Fe(III)$ trong môi trường huyết tương của người sau khi tiếp xúc (2 phút) với hỗn hợp 1 (tính theo $nM MoO_4^{2-}$).

Fig. 4 minh họa toán đồ thể hiện hiệu quả oxy hóa khử của hỗn hợp 1 ở các nồng độ khác nhau sau đó.

Fig. 5 minh họa sự ảnh hưởng của hỗn hợp 1 với nồng độ khác nhau của MoO_4^{2-} đối với sự sản xuất Fe^{3+} tại chỗ ở huyết tương của người, i) có nguồn gốc từ phức chất transferrin- Fe^{3+} sau khi tiếp xúc với chế phẩm, ii) ở trạng thái cân bằng Fe^{2+}/Fe^{3+} và, iii) ở trạng thái oxy hóa quercetin.

Fig. 6 minh họa sự sản xuất interleukin-6 (IL-6) trong dịch nổi trên bề mặt của môi trường nuôi cấy của da sinh thiết người không gây bệnh (2 phút) được kích thích bởi hỗn hợp 1 (24,3 μM hoạt chất) hoặc NaCl (100mM) làm đối chứng. (D1-5: vật cho 1 đến 5, B1 hoặc 2: sinh thiết 1 hoặc 2).

Fig. 7 minh họa khả năng sản xuất trung bình ở 6h và 24h sau khi tiếp xúc với interleukin-6 (IL-6) trong dịch nổi trên bề mặt của môi trường nuôi cấy của da sinh thiết của người được kích thích không gây bệnh (2 phút) bởi hỗn hợp 1 (24,3 μM hoạt chất) hoặc NaCl (100mM) làm đối chứng.

Fig. 8 thể hiện hiệu quả của thể oxy hóa khử của hỗn hợp 1 và hỗn hợp 2 ở các nồng độ khác nhau (độ hấp thụ quercetin bởi Fe(III) trong môi trường huyết tương của người sau khi tiếp xúc (2 phút) với hỗn hợp 1 (tính theo nM MoO_4^{2-}) hoặc với hỗn hợp 2 (tính theo nM $\text{La}(\text{MoO}_4)^{1-}$).

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra có thể giải quyết được các vấn đề kỹ thuật nêu trên bằng cách tạo ra hỗn hợp được phẩm hoặc có hoạt tính điều trị chứa ít nhất một peroxometalat.

«Dược tính» trên thực tế có nghĩa là hỗn hợp hoặc chế phẩm có hoạt tính có lợi nằm trong phạm vi điều trị bệnh.

Thuật ngữ « hỗn hợp » được dùng để chỉ chế phẩm và không hạn chế việc đề cập đến phương pháp điều chế hoặc sản xuất chế phẩm cụ thể. Thuật ngữ « hỗn hợp » trong bản mô tả này đưa ra cách phân biệt dễ dàng hơn giữa quan điểm về ngữ nghĩa của « hỗn hợp » với « chế phẩm », ví dụ, cụ thể là khi « hỗn hợp » được hợp nhất thành « chế phẩm » bao gồm các thành phần khác.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập cụ thể hơn đến chế phẩm hoặc hỗn hợp, tốt hơn là có hoạt tính điều trị bệnh khi dùng khu trú, chứa:

- ít nhất một muối kim loại, kim loại này được chọn từ nhóm bao gồm molypden (Mo), vonfram (W), vanadi (V), vàng (Au), dãy lantanoid, cụ thể là lantan;
- ít nhất một chất càngh hóa;
- ít nhất một nguồn chứa gốc peroxit hóa;

- ít nhất một chất đệm.

Có lợi, nếu sáng chế đề xuất chế phẩm hoặc hỗn hợp, tốt hơn là có hoạt tính điều trị bệnh khi dùng khu trú, chứa:

- ít nhất một muối kim loại, kim loại này được chọn từ molybden (Mo), vonfram (W), vanadi (V), vàng (Au), dãy lantanoid, cụ thể là lantan;

- ít nhất một chất cation hóa;

- ít nhất một nguồn chứa gốc peroxit hóa;

- ít nhất một chất đệm;

- tốt hơn, nếu hỗn hợp hoặc chế phẩm này có thể oxy hóa khử nằm trong khoảng từ 250 đến 550 mV, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 300 đến 450 mV và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 300 đến 420 mV.

Có lợi, nếu hỗn hợp theo sáng chế có khả năng bào chế thuốc, và cụ thể hơn là thuốc ổn định và có hoạt tính dùng tại chỗ.

Hỗn hợp theo sáng chế tồn tại ở dạng cân bằng của các hợp chất nêu trên theo cách có lợi để tạo ra phức chất peroxit kim loại bao gồm các muối của nó. Không bị ràng buộc bởi giả thuyết bất kỳ, các tác giả sáng chế cho rằng hỗn hợp theo sáng chế có khả năng tạo ra cấu trúc siêu phân tử ở dạng mạng tinh thể ở trạng thái ổn định không vĩnh cửu, mà có khả năng tạo ra ở mức ngoại tế bào và là chất xúc tác tại chỗ cho các phản ứng tương tự Fenton và Haber-Weiss. Các phản ứng này được gọi là « tương tự » khi chúng xảy ra do kim loại của hỗn hợp theo sáng chế hoặc kim loại khác mà không phải là sắt gây ra. Một phần chất phản ứng đã được tạo ra tùy ý bởi hoạt chất thấm vào tế bào, và có lợi hơn là tế bào đã nhiễm virus.

Theo phương án khác, chế phẩm bao gồm một vài muối kim loại, kim loại này được chọn từ molybden (Mo), vonfram (W), vanadi (V), vàng (Au), dãy lantanoid, cụ thể là lantan.

Tùy thuộc vào phương pháp sản xuất, muối kim loại là muối molybden hoặc muối của molybden.

Theo phương pháp sản xuất, muối kim loại là muối lantanit hoặc của dãy lantanit.

Theo phương pháp sản xuất, muối kim loại là hỗn hợp chứa muối molybden và muối lantanit.

Có lợi, nếu sáng chế đề xuất chế phẩm hoặc hỗn hợp, tốt hơn là có hoạt tính điều trị bệnh khi dùng khu trú, chứa:

- ít nhất một muối molybden (Mo), tùy ý kết hợp với ít nhất một muối của kim loại được chọn từ vonfram (W), vanadi (V), vàng (Au), dãy lantanit, cụ thể là lantan;

- ít nhất một chất càng hóa;

- ít nhất một nguồn chứa gốc peroxit hóa;

- ít nhất một chất đệm;

- tốt hơn, nếu hỗn hợp hoặc chế phẩm này có thể oxy hóa khử nằm trong khoảng từ 250 đến 550 mV, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 300 đến 450 mV và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 300 đến 420 mV.

Tốt hơn, nếu muối kim loại có mặt ở dạng (các) oxit hoặc (các) peroxit trong hỗn hợp. Có lợi, nếu các oxit kim loại của hỗn hợp theo sáng chế có khả năng tạo ra hợp chất trung gian là axit kim loại, và cụ thể hơn là axit Lewis.

Theo cách khác, hợp chất kim loại được ưu tiên đối với trạng thái oxy hóa kim loại tương hợp với phản ứng “tương tự” Fenton-Haber-Weiss và Fenton-Haber-Weiss (phản ứng oxy hóa khử của các ion kim loại khác như sắt, mà trong trường hợp đó là phản ứng càng hóa) chưa ổn định, tức là, phần lớn các kim loại chuyển tiếp và cụ thể là Mo(VI), W(IV) đến (VI), V(III) đến (V), Au(I) đến (III).

Theo cách khác, hợp chất dãy lantanit được ưu tiên mà có thể tạo ra sesquioxit dạng LnO_3 , đối với trạng thái oxy hóa tương hợp với phản ứng « tương tự » Fenton-Haber-Weiss và Fenton-Haber-Weiss chưa ổn định và đặc biệt là La(III) , Ce(III) và (IV) , Nd(III) và (IV) , Sm(III) và (IV) , Gd(IV) .

Có lợi, nếu kim loại của metalat hoặc lanthanat có hóa trị tối đa.

Có lợi, nếu kim loại hoặc dãy lantanit được oxy hoá thành dạng có mức oxy hóa tối đa.

Theo phương án được ưu tiên khác, muối kim loại là muối molybden. Do đó, theo cách khác, muối kim loại là muối molybden. Đặc biệt tốt hơn, nếu hỗn hợp theo sáng chế chứa natri molybdat. Theo sáng chế, việc sử dụng muối molybden là được ưu tiên, trong đó hóa trị của molybden ở mức VI. Có lợi, nếu muối này có khả năng tạo ra độ ổn định đáng kể cho hỗn hợp chứa các thành phần. Hơn nữa, molybden, đặc biệt là ở dạng muối và ví dụ ở dạng muối natri, có hóa trị hoạt động của chúng (VI), ái lực điện tử tương hợp của nó, độc tính tế bào rất thấp của nó, khả năng phản ứng Fenton-Haber-Weiss của nó có thể là « tương tự », là được đặc biệt ưu tiên.

Theo cách khác, muối kim loại đã được tạo ra chứa peroxometalat, và cụ thể hơn là có thể được tìm thấy ở dạng trung gian hydro-peroxometalat.

Có lợi, nếu muối molybden được ưu tiên chứa đơn vị peroxo hoặc hydroperoxo. Có lợi hơn nữa nếu, hoạt chất có kiểu MoO_4^{2-} hoặc dạng hydro-peroxo của nó (xem Oyerinde Oyeyemi F. et al., Solution structure of axit molybdic from Raman spectroscopy and DFT analysis, Inorganica Chimica Acta 361 (2008) 1000–1007. Doi:10.1016/j.ica.2007.06.025), ví dụ, phức chất trung gian có công thức dạng $\text{Na}_4[\text{Mo}_2\text{O}_6(\text{càng hóa})].10\text{H}_2\text{O}$ trong hỗn hợp theo sáng chế.

Theo cách khác, kim loại và muối của nó là dãy lantanit hoặc muối của nó.

Theo cách khác, muối kim loại đã được tạo ra chứa peroxolanthanat, và cụ thể hơn là có thể vẫn được tìm thấy ở dạng trung gian hydro-peroxolanthanat. Ví dụ, nó có thể vẫn được tìm thấy ở dạng phức chất trung gian có công thức $\text{NaLn}(\text{càng}$

hóa). $x\text{H}_2\text{O}_2.y\text{H}_2\text{O}$ (với x và y tùy thuộc vào kiểu dãy lantanit (Ln) được sử dụng trong hỗn hợp theo sáng chế).

Có lợi, nếu molypden và muối lantanit, và cụ thể hơn là lantan, tốt hơn là đơn vị peroxo hoặc hydroperoxo (xem Suponitskiy, Y.L., Proshina, O.P., Dyunin, A.G. et al. Thermodynamic properties of lantan Molybdates, Russ. J. Phys. Chem. (2016) 90:267. Required: 10.1134/S00360244160202031X).

Có lợi, nếu việc sử dụng muối molypden có khả năng hạn chế được độc tính tế bào của hỗn hợp theo sáng chế, cụ thể trên hồng cầu và tế bào lympho, biểu mô, nguyên bào sợi, nguyên bào xương.

Có lợi, nếu sử dụng molypden ở dạng tự nhiên làm đồng yếu tố enzym (như, ví dụ, xanthin oxidaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza với feredoxin, v. v...).

Có lợi, nếu việc sử dụng muối lantan có khả năng hạn chế được độc tính tế bào của hỗn hợp theo sáng chế.

Theo phương án được ưu tiên khác, kim loại ở dạng hoạt chất của nó đóng vai trò làm chất xúc tác để sản xuất các chất hoạt động $\text{HO}_2^\cdot$, và tùy ý là $\text{HO}^\cdot$ và $\text{O}_2^\cdot$.

Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế chứa muối kim loại với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 500 μM , và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 200 μM , và còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5 đến 150 μM .

Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế chứa muối kim loại của molypden với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100 μM , và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 50 μM , và còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5 đến 30 μM .

Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế chứa muối kim loại của lantan với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100 μM , và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 50 μM , và còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5 đến 30 μM .

Thuật ngữ «các chất càng hóa» (hoặc «chất càng hóa») tương ứng với hợp chất hoá học có khả năng tạo ra phức chất phối trí ổn định với một hoặc một vài ion và cụ thể hơn là với các dạng ion của kim loại có mặt trong chế phẩm. Kim loại có thể có mặt ở dạng bất kỳ bao gồm ở dạng peroxit hóa hoặc hydroperoxit hóa. Phức chất này còn được gọi là «chelate».

Chất càng hóa có thể là thích hợp cho hỗn hợp theo sáng chế có lợi để làm chất xúc tác ngoại bào, một mặt tạo ra tại chỗ các gốc hoạt động $\text{HO}_2^\cdot$; mà phần lớn còn là $\text{O}_2^\cdot$ và $\text{OH}^\cdot$ và cho phép quá trình càng hóa giữa canxi và các ion kim loại bao gồm các ion sắt II (Fe(II) hoặc Fe^{2+}) và các ion sắt III (Fe(III) hoặc Fe^{3+}) được gắn kết ngoại bào hoặc không được gắn kết. Quá trình giải phóng các chất phản ứng này đạt hiệu quả hơn do ái lực của các chelat đối với các ion ngoại bào Ca^{2+} và $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ là đáng kể. Các chelat này là các hợp chất ổn định có mặt trong hỗn hợp có hoạt tính được lý theo sáng chế và ngoài việc tham gia vào việc sản xuất ưu tiên gốc $\text{HO}_2^\cdot$, có hoạt tính được lý hoặc điều trị của hỗn hợp theo sáng chế, đặc biệt là quá trình càng hóa tại chỗ ưu tiên của các ion canxi và sắt. Quá trình càng hóa tại chỗ này có thể cũng cho phép xảy ra quá trình điều biến ở mức ngoại tế bào của dòng canxi tế bào, cụ thể là một mặt gây ra bởi bệnh nhiễm virus, như ví dụ bởi *Herpesviridae*, và mặt khác bởi ứng suất oxy hóa do sự có mặt của các gốc hoặc hợp chất peroxo.

Có lợi, nếu chất càng hóa không gây thâm tế bào và ở ngoại bào.

Theo phương án được ưu tiên khác, chất càng hóa làm ổn định peroxo và các phức chất hydro-peroxomolybdat được chứa trong chế phẩm. Các peroxo- và hydro-peroxomolybdat như vậy có thể là loại $(\text{Mo}_2\text{O}_6)^{4+}$ và $[\text{Mo}_4\text{O}_{12}(\text{O}_2)_2]^{4+}$.

Có lợi, nếu theo cách khác, chất càng hóa cho phép làm ổn định bởi quá trình càng hóa hoạt chất ion MoO_4^{2-} , ở dạng natri của nó có phân tử lượng là 205,937 g/mol hoặc peroxomolybdat (ví dụ, ở dạng $\text{MoO}_3\text{-BAPTAH}_2^{2-}$ và/hoặc $\text{MoO}_3\text{-EGTAH}_2^{2-}$).

Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế chứa ít nhất hai chất càng hóa.

Có lợi, nếu (các) chất càng hóa gắn kết bởi liên kết phối trí của metalat được oxy hóa hoặc metalat được peroxit hóa trong dung dịch.

Theo cách khác, chất càng hóa tạo ra phức chất với metalat được oxy hóa hoặc metalat được peroxit hóa để tạo ra phức chất dime trung gian $[\text{Mo}_2\text{O}_6(\text{chất càng hóa})]^{4+} \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ và/hoặc dạng peroxotetramolybdat(VI) $[\text{Mo}_4\text{O}_{12}(\text{O}_2)_2]^{4+}$ - Chất càng hóa, khi muối kim loại là muối molybden.

Theo cách khác, chất càng hóa tạo ra phức chất với metalat được oxy hóa hoặc metalat được peroxit hóa để tạo ra phức chất $[\text{W}_2\text{O}_6(\text{chất càng hóa})]^{4+} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, khi muối kim loại là muối vonfram.

Theo cách khác, chất càng hóa tạo ra phức chất với lanthanat được oxy hóa hoặc lanthanat được peroxit hóa để tạo ra đặc biệt phức chất $[\text{La}(\text{O}_2)\text{-(chất càng hóa)}]^{2+} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ khi muối lantanoit là muối lantan.

Có lợi, nếu chất càng hóa là tương hợp với việc bắt giữ trong không gian của các phức chất được oxy hóa và/hoặc được peroxit hóa của metalat. Cụ thể hơn, kích thước của « túi » N---N của nó sẽ tách các gốc carboxylic liên quan trong quá trình liên kết phối trí cũng như sự gấp nếp trong không gian của chuỗi cacbon của túi này sẽ tương hợp theo cách có lợi với việc bắt giữ phức chất kim loại trung gian, đặc biệt ở dạng được oxy hóa peroxit hóa. Có lợi, nếu chất càng hóa là tương hợp với việc mang điện tử của metalat và với cấu trúc obitan ngoại nguyên tử của nó.

Theo một khía cạnh, (các) chất càng hóa được chọn từ các polyaxit hữu cơ và các muối của chúng, đặc biệt là polyaxit amino-carboxylic. Thông thường, polyaxit amino-carboxylic chứa một hoặc một vài nguyên tử nitơ của nhóm chức amin, tốt hơn là amin bậc hai hoặc bậc ba gắn kết với ít nhất hai nhóm axit carboxylic, via các nguyên tử, nói chung cacbon và tùy ý nguyên tử oxy.

Theo cách khác, (các) chất càng hóa ví dụ có ít nhất ba nhóm phối trí, tốt hơn là các nhóm axit carboxylic, ở ba đầu của (các) phân tử tạo ra (các) chất càng hóa, các

nhóm phối trí này cần được tách bằng chuỗi gồm ít nhất ba nguyên tử bao gồm ít nhất một nguyên tử nitơ.

Có lợi, nếu (các) chất càng hóa có năm nhóm phối trí, tốt hơn là các nhóm axit carboxylic, ở năm đầu của (các) phân tử tạo ra (các) chất càng hóa, các nhóm phối trí này cần được tách bởi chuỗi gồm ít nhất sáu nguyên tử và tốt hơn là chín nguyên tử, bao gồm một nguyên tử nitơ và tốt hơn là hai nguyên tử nitơ được tách bằng ít nhất hai nguyên tử.

Theo cách khác, (các) chất càng hóa có bốn nhóm phối trí, tốt hơn là các nhóm axit carboxylic, ở bốn đầu của (các) phân tử tạo ra (các) chất càng hóa, các nhóm phối trí này cần được tách bởi chuỗi gồm ít nhất sáu nguyên tử và tốt hơn là mười hai nguyên tử, bao gồm hai nguyên tử nitơ được tách bằng ít nhất tám nguyên tử.

Theo cách khác, các nguyên tử tách các nhóm phối trí này và/hoặc nguyên tử nitơ của (các) chất càng hóa được chọn từ nguyên tử cacbon, nitơ và oxy. Một số nguyên tử tách các nhóm phối trí này và/hoặc nguyên tử nitơ của (các) chất càng hóa có thể bao gồm trong một hoặc một vài vòng nguyên tử giống hoặc khác nhau, ví dụ, như nhân không thơm, thơm hoặc nhân dị vòng thơm, ví dụ, phenyl hoặc pyridyl.

Có lợi, nếu chất càng hóa được chọn từ nhóm gồm BAPTA (axit 1,2-bis(o-aminophenoxy)etan-*N,N,N',N'*-tetraaxetic), EGTA: (axit etylen glycol-bis(2-aminoetylete)-*N,N,N',N'*-tetraaxetic)), DTPA (axit diethylentriaminepentaaxetic), và chất bất kỳ trong số các hỗn hợp của chúng.

Theo cách khác, chất càng hóa được chọn từ nhóm gồm BAPTA, EGTA và bất kỳ trong số các hỗn hợp của chúng.

Có lợi, nếu BAPTA và/hoặc EGTA làm ổn định các tiền chất tốt hơn cũng như hiệu suất tổng hợp tốt hơn.

Độ pKa của 4 nhóm carboxylic BAPTA là: pK1 và pK2 < 4 (BAPTA không hòa tan), pK3 = 5,47, và pK4 = 6,36; và của EGTA là: pK1 = 2,00, pK2 = 2,65, pK3 = 8,85, và pK4 = 9,46.

Có lợi, nếu độ pKa của (các) chất càng hóa là tương hợp với độ pH của dung dịch theo sáng chế.

Có lợi, nếu độ pKa của (các) chất càng hóa là tương hợp với độ pKa của axit kim loại hoặc peraxit kim loại tạo ra làm trung gian trong dung dịch theo sáng chế.

Có lợi, nếu độ pKa của (các) chất càng hóa là tương hợp với độ pH của vùng nhiễm bệnh, ví dụ, như biểu mô.

Có lợi, nếu (các) chất càng hóa được chọn ít gây độc tế bào. Đây là trường hợp đặc biệt của BAPTA và EGTA.

Muối kim loại và chất càng hóa có mặt với lượng đủ và tỷ lệ tạo ra phức chất {peroxo-metalat – càng hóa} chất}.

Tốt hơn, nếu ít nhất một trong số các chất càng hóa có mặt có ái lực đối với canxi lớn hơn so với kim loại được sử dụng trong hỗn hợp theo sáng chế. Điều này là có lợi cho việc thể phức chất chelat của hỗn hợp theo sáng chế bằng phức chất càng hóa canxi *in vivo*. Có lợi, nếu nồng độ của chelat là tương hợp với nồng độ của Ca^{2+} ngoại bào (2-3mM trong huyết tương người), tức là (các) chất càng hóa có mặt trong hỗn hợp theo sáng chế có mặt với lượng đủ để tạo ra phức chất thích hợp để điều trị với sự có mặt của canxi ngoại bào.

Có lợi, nếu chelat có mặt có ái lực đối với sắt ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) lớn hơn so với kim loại được sử dụng trong hỗn hợp theo sáng chế. Điều này là có lợi cho việc thể phức chất chelat của hỗn hợp theo sáng chế bằng phức chất càng hóa- $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, *in vivo*.

Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế chứa chất càng hóa với lượng nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 1 mM.

Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế chứa BAPTA với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100 μM , và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 50 μM , và còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5 đến 20 μM . Theo một phương án khác, hỗn hợp

theo sáng chế chứa BAPTA nằm trong khoảng từ 1 đến 80 μM , và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20 đến 80 μM .

Theo cách khác nữa, hỗn hợp theo sáng chế chứa nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1 mM, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 800 μM , và còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 200 đến 700 μM EGTA. Theo một phương án khác, hỗn hợp theo sáng chế chứa EGTA với lượng nằm trong khoảng từ 200 đến 2,000 μM , và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 600 đến 1,400 μM .

Theo cách khác nữa, hỗn hợp theo sáng chế chứa BAPTA và EGTA có mặt với nồng độ lần lượt nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 1 mM, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 20 μM và nằm trong khoảng từ 200 đến 700 μM .

Theo cách khác, muối molybden và chất càng hóa có mặt với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 10/1 đến 1/100 (tỷ lệ: muối Mo/chất càng hóa, được biểu thị bằng nồng độ mol).

Theo cách khác, muối lantan và chất càng hóa có mặt với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 10/1 đến 1/100 (tỷ lệ: muối La/chất càng hóa, được biểu thị bằng nồng độ mol).

Theo cách khác, muối molybden và BAPTA có mặt với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 3/1 đến 1/10, được biểu thị bằng nồng độ mol.

Theo cách khác, muối molybden và EGTA có mặt với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1/10 đến 1/70, được biểu thị bằng nồng độ mol.

Theo cách khác, muối lantan và BAPTA có mặt với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 3/1 đến 1/10, được biểu thị bằng nồng độ mol.

Theo cách khác, muối lantan và EGTA có mặt với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1/10 đến 1/70, được biểu thị bằng nồng độ mol.

Theo cách khác, nguồn chứa các gốc chủ yếu là H_2O_2 .

Theo cách khác, một hoặc một vài nguồn thứ cấp chứa các gốc có thể được bổ sung hoặc được tổng hợp với lượng nhỏ tại chỗ.

Theo cách khác, H_2O_2 là dung dịch nước chứa H_2O_2 ở 110 thể tích hoặc 30% hoặc 8,82M.

Có lợi, nếu nguồn H_2O_2 không chứa chất ổn định bất kỳ được chọn từ nhóm gồm: axit pyridin-carboxylic, ví dụ, như axit picolinic; độ pH axitosphonic và axit aminophosphonic; amit hoặc amin được thế; axit alkylsulfonic; và hỗn hợp của chúng.

Theo cách khác, nguồn chủ yếu chứa gốc peroxit hóa là hydro peroxit. Do đó, theo phương án khác này, hydro peroxit có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 200 đến 600 mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 300 đến 500 mM, và còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 340 đến 450 mM.

Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế chứa tỷ lệ hydro peroxit nằm trong khoảng từ 30 mM đến 4,4 M, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 150 mM đến 3 M, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 235 mM đến 1,8 M, và còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 260 mM đến 440 mM. Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế không chứa peraxit bổ sung ngay tức thì bất kỳ.

Có lợi, nếu lượng (hoặc nồng độ) của hydro peroxit (H_2O_2) được thử nghiệm bằng cách chuẩn độ. Thông thường, có thể sử dụng thử nghiệm bằng dung dịch kali permanganat.

Nồng độ hydro peroxit cũng có thể được thử nghiệm bằng cách đo quang phổ UV.

Có lợi, nếu chất đệm được sử dụng để kiểm soát cụ thể độ pH của hỗn hợp theo sáng chế.

Có lợi, nếu chất đệm được sử dụng để kiểm soát cụ thể độ pH trong quá trình dùng *tại chỗ* dung dịch theo sáng chế.

Trong số các chất đệm, axit carboxylic được ưu tiên.

Tốt hơn, nếu chất đệm không chứa các axit sau: axit carboxylic được hydroxyl hóa (ví dụ, axit malic) hoặc axit polycarboxylic (ví dụ, axit xitric và isocitric, axit malonic); axit carboxylic có phân tử lượng lớn hơn 100 g/mol và cụ thể là axit carboxylic mạch dài (lớn hơn C_6) do làm mất ổn định màng tế bào mà chúng có thể tạo ra, cũng như axit carboxylic không bão hòa (axit sorbic chẳng hạn) do khả năng peroxy hóa của loại alkenoic gây độc tế bào.

Theo cách khác, sáng chế bao gồm sự có mặt của các axit nhất định tạo ra *tại chỗ* trong quá trình tổng hợp, tốt hơn là với lượng nhỏ (ví dụ, như axit peraxetic). Chúng được sử dụng làm nguồn phụ chứa các gốc trong quá trình sản xuất theo sáng chế và sử dụng trong điều trị theo sáng chế.

Theo cách khác, chất đệm có độ pKa ở độ pH sinh lý (da và niêm mạc), tức là độ pH, ví dụ, nằm trong khoảng từ 4,4 đến 5,0 và tương hợp với độ pKa của axit kim loại được oxy hóa và/hoặc axit kim loại được peroxit hóa, dạng của chúng được ion hóa (ví dụ, MoO_4H_2 , $pK_1 = 3,61$ và độ $pK_{a2} = 3,89$) được ưu tiên.

Tốt hơn, nếu chất đệm có mặt trong hỗn hợp theo sáng chế với nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 500 mM, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 200 mM, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50 đến 100 mM.

Tỷ lệ của nồng độ mol của hydro peroxit và chất đệm nằm trong khoảng từ 2 đến 9 và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

Có lợi, nếu hỗn hợp được tạo đệm để thu được độ pH nằm trong khoảng từ 4,4 đến 5,0 mà là tương hợp i) để tiếp xúc theo sáng chế với da và màng niêm mạc, ii) độ ổn định của hoạt chất MoO_4^{2-} với sự có mặt của H_2O_2 , iii) phản ứng xúc tác Fenton-Haber-Weiss « tương tự » hoặc không, và, iv) tạo ra *tại chỗ* các loại gốc chủ yếu là loại $HOO\cdot$.

Theo cách khác, hỗn hợp chứa làm chất đệm cho phép độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,2, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4,4 đến 5,0, ví dụ, axit carboxylic, và tốt hơn là axit axetic.

Có lợi, nếu hỗn hợp có thế oxy hóa khử nằm trong khoảng từ 350 đến 450 mV, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 350 đến 420 mV.

Hiệu quả oxy hóa khử của hỗn hợp theo sáng chế cũng có thể được ước tính bằng cách oxy hóa *in vitro* quercetin bởi các ion sắt(III) hoặc Fe^{3+} . Lưu ý rằng có thể sử dụng thuật ngữ được gọi là phương pháp thử nghiệm « phương pháp quercetin », (ví dụ, theo các nghiên cứu của El Hajji H. et al (2006) "*Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation*", Free Radic. Res., 40(3), 303-320 and Balcerzak M. et al (2008) "*Selective determination of Fe(III) in Fe(II) samples by UV-spectrophotometry with the aid of quercetin and morin*", Acta Pharm., 58, 327-334).

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế hỗn hợp như được xác định theo sáng chế. Đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế hỗn hợp theo sáng chế bao gồm (i) điều chế dung dịch đệm (BS) chứa chất đệm có độ pH axit, (ii) điều chế dung dịch chứa phức chất kim loại (CS) chứa muối kim loại oxit, (iii) điều chế dung dịch ban đầu thứ nhất (Si1) chứa hydro peroxit, (iv) điều chế dung dịch ban đầu thứ hai (Si2) bằng cách trộn dung dịch BS với dung dịch Si1, (v) điều chế dung dịch (S1) chứa hợp chất peroxo-kim loại bằng cách trộn dung dịch CS với dung dịch Si2, (vi) điều chế dung dịch S2 bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch S1 bằng bazơ, độ pH của dung dịch S2 có tính bazơ hơn so với độ pH của dung dịch BS, (vii) bổ sung một hoặc một vài chất càng hóa vào dung dịch S2, (viii) tùy ý điều chỉnh độ pH, (ix) tùy ý điều chỉnh thể tích của dung dịch cuối, hỗn hợp có hoạt tính được lý thu được như được xác định theo sáng chế.

Tùy thuộc vào các biến đổi, khi hai hoặc nhiều muối oxit kim loại được sử dụng, với các oxit kim loại khác nhau, việc điều chế dung dịch chứa phức chất kim loại (SC) có thể bao gồm bước tách các dung dịch đối với mỗi muối kim loại oxit và

sau đó trộn các dung dịch này đồng thời hoặc lần lượt với dung dịch Si2 để điều chế dung dịch S1.

Tốt hơn, nếu quy trình điều chế hỗn hợp theo sáng chế thu được theo phương pháp tổng hợp xúc tác. Việc tổng hợp xúc tác hỗn hợp theo sáng chế thường diễn ra liên tiếp. Có lợi, nếu phương pháp theo sáng chế chứa trình tự các bước (iii) => (iv) => (v) => (vi) => (vii) => (viii) => (ix).

Có lợi, nếu phương pháp điều chế có thể được tiếp tục bằng cách phân tích phổ (ví dụ, bằng cách phân tích IR, UV và/hoặc phổ khả kiến) ở một hoặc một vài bước điều chế, và tốt hơn là trong toàn bộ các bước điều chế.

Theo cách khác, dung dịch ban đầu thứ nhất Si1 có thể oxy hóa khử thứ nhất lớn hơn thế oxy hóa khử của hỗn hợp theo sáng chế.

Tốt hơn, nếu sau bước (ix), không có sự pha loãng thể tích của hỗn hợp sao cho tránh được sự thay đổi trạng thái cân bằng hóa học của hỗn hợp theo sáng chế.

Đương nhiên Có lợi, nếu sử dụng các chất hoặc các hợp chất có độ tinh khiết đủ thỏa mãn làm các nguyên liệu thô. Đặc biệt cần thiết nếu các chất hoặc các hợp chất khác nhau có độ tương hợp nhằm mục đích điều trị.

Theo cách khác, có thể tiến hành IR-FT, NMR-H và/hoặc phổ khối trên hỗn hợp đã được tạo ra theo sáng chế để đảm bảo sự tuân thủ dùng chế phẩm của hỗn hợp theo yêu cầu trong công nghiệp, và cụ thể là để sử dụng trong điều trị bằng dược phẩm. Cũng tốt hơn, nếu việc đo phổ IR-FT được tiến hành trên các thành phần tiền thân của hỗn hợp theo sáng chế.

Theo cách khác, độ pH có thể được kiểm soát ở một hoặc một vài, hoặc thậm chí là tất cả các bước điều chế.

Theo cách khác, thế oxy hóa khử có thể được kiểm soát ở một hoặc một vài, hoặc thậm chí là tất cả các bước điều chế.

Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế có thể được kiểm soát bằng cách đo tỷ trọng, và/hoặc đo ảnh phổ UV, ở một hoặc một vài, hoặc thậm chí là tất cả các bước điều chế.

Theo cách khác, có thể thử nghiệm hiệu quả oxy hóa khử của hỗn hợp theo sáng chế bằng phương pháp quercetin (Thử nghiệm phổ ảnh UV của quá trình oxy hóa *in vitro* quercetin bởi Fe^{3+} có mặt hoặc được tạo ra *in vitro*).

Có lợi, nếu hydro peroxit có mặt trong dung dịch Si1 với nồng độ nằm trong khoảng từ 200 đến 600 mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 300 đến 500 mM, và còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 330 đến 460 mM.

Theo một phương án, nguyên liệu sử dụng là kim loại và tốt hơn là thép không gỉ, tùy ý kim loại chậm phản ứng.

Theo một phương án, nguyên liệu có thể là tiếp tục làm chậm phản ứng trong quá trình điều chế hỗn hợp theo sáng chế, ví dụ, bằng cách cho nguyên liệu (mà sẽ tiếp xúc với hỗn hợp hoặc các tiền chất của nó) tiếp xúc với dung dịch hydro peroxit.

Tốt hơn, nếu tiến hành thử nghiệm nguồn hydro peroxit để đảm bảo lượng hydro peroxit có mặt và dùng nó để điều chế hỗn hợp theo sáng chế. Thử nghiệm này có thể được tiến hành, ví dụ, bằng cách chuẩn độ hoặc bằng cách đo ảnh phổ UV (nói chung ở 240 nm).

Có lợi, nếu độ pH của dung dịch đệm BS nằm trong khoảng từ 4,4 đến 5,0, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4,7 đến 4,8.

Có lợi, nếu chất đệm của dung dịch BS là chất đệm axit carboxylic/carboxylat, và dung dịch BS có tỷ lệ hydro peroxit/carboxylat nằm trong khoảng từ 20/1 đến 1/1, và tốt hơn là khoảng 5/1.

Có lợi, nếu tỷ lệ của axit axetic (AcOH) có muối axetat đã được bổ sung của nó với lượng giới hạn, cho phép tạo ra lượng axit peraxetic (AcOOH) nhỏ nhất. Có lợi,

nếu trong phương pháp điều chế theo sáng chế, lượng axit peraxetic tạo ra tối thiểu và ảnh hưởng của chất xúc tác của nó là rất nhỏ.

Quy trình điều chế dung dịch ban đầu thứ nhất Si1 bao gồm việc điều chế dung dịch nước axit carboxylic, và tốt hơn là axit axetic và sau đó bổ sung hydro peroxit vào.

Tốt hơn, nếu dung dịch ban đầu thứ nhất Si1 có độ pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,6, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2,7 đến 4,2. Có lợi, nếu dung dịch ban đầu thứ nhất Si1 có thế oxy hóa khử nằm trong khoảng từ 400 đến 550 mV, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 420 đến 500 mV.

Có lợi, nếu phương pháp bao gồm việc đo thế oxy hóa khử ở bước (iii) đến (ix), và tốt hơn là cũng bao gồm việc đo độ pH ở bước (iii) đến (ix).

Theo cách khác, dung dịch ban đầu thứ hai Si2 có độ pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 3,2, và tốt hơn là khoảng 2,9. Theo cách khác, dung dịch ban đầu Si2 có thể oxy hóa khử lớn hơn thế oxy hóa khử của dung dịch ban đầu thứ nhất Si1. Thế oxy hóa khử của dung dịch ban đầu thứ hai Si2 có thể nằm trong khoảng từ 420 đến 570 mV, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 440 đến 520 mV.

Theo cách khác, dung dịch đệm BS được đưa vào dung dịch ban đầu thứ nhất Si1.

Theo một phương án, nồng độ hydro peroxit trong dung dịch ban đầu thứ hai Si2 nằm trong khoảng từ 300 đến 500 mM, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 260 đến 440 mM.

Có lợi, nếu ở bước (iv), độ pH được duy trì nhỏ hơn giới hạn pH có thể chấp nhận được cho phản ứng tổng hợp xúc tác đối với hỗn hợp theo sáng chế. Có lợi, nếu chất đệm được sử dụng ở bước (iv).

Có lợi, nếu ở bước (iv) lượng tạo ra axit peraxetic *tại chỗ* là tối thiểu.

Có lợi, nếu ở bước (iv) thế oxy hóa khử của dung dịch S1 ở bước (iii) được tăng lên, ví dụ, dao động trong khoảng trị số nằm trong khoảng từ 440 đến 460mV đến trị số nằm trong khoảng từ 460 đến 480mV ở bước (iv).

Bằng cách xem xét nồng độ hydro peroxit có mặt trong quá trình điều chế hỗn hợp theo sáng chế, quá trình tạo ra peroxit được quan sát trong khi đưa nó vào, tức là cho hydro peroxit tiếp xúc với dung dịch đệm (bước (iv)). Có lợi, nếu việc bổ sung hydro peroxit được thực hiện trong dung dịch đệm trong nước có ă ã để thu được độ pH axit. Do đó, đối với quy trình điều chế dung dịch ban đầu thứ nhất S1, hydro peroxit được bổ sung vào dung dịch có độ pH axit, và ví dụ có độ pH nằm trong khoảng từ 2,7 đến 4,2.

Có lợi, nếu bước (iv) làm thay đổi trạng thái cân bằng hướng tới việc tạo ra H_2O_2 tại chỗ cùng với việc phá huỷ axit peraxetic đã được tạo ra bởi trạng thái cân bằng hóa học.

Theo cách khác, dung dịch đệm CS được đưa vào dung dịch S1.

Theo cách khác, dung dịch S1 chứa phức chất peroxit kim loại có độ pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 3,5, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2,8 đến 3,0.

Theo một phương án, thế oxy hóa khử của dung dịch S1 chứa chất peroxit kim loại nằm trong khoảng từ 400 đến 550 mV, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 440 đến 500mV.

Theo một phương án, nồng độ hydro peroxit trong dung dịch S1 chứa chất peroxit kim loại nằm trong khoảng từ 250 đến 500 mM, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 320 đến 450 mM.

Ở bước (v), muối molydat đã được bổ sung vào ở dạng axit molybdic $MoO_3.H_2O$ và $MoO_3.2H_2O$.

Trong các điều kiện không theo sáng chế, quá trình tổng hợp ở trạng thái cân bằng hoạt chất MoO_4^{2-} , ở nhiệt độ trong phòng, mà không có chất xúc tác bất kỳ và không bổ sung axit mạnh bất kỳ (H_2SO_4 chẳng hạn) có thể cần diễn ra trong vài ngày.

Theo một phương án, độ pH của dung dịch S2 được tạo đậm tới trị số tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4,4 và 5,0, và ví dụ nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,0. Có lợi, nếu ở độ pH được tạo đậm này, nó là dạng không ổn định MoO_4^{2-} mà chiếm ưu thế (trạng thái oxy hóa Mo(VI)) và hydro peroxit được làm ổn định. Hydro peroxit thường được làm ổn định trong công nghiệp bởi dung dịch đậm phosphat. hợp chất trung gian không ổn định phosphomolybdat (màu vàng) có thể tạo ra mà không xuất hiện ở trạng thái cân bằng, tạo ra H_2O_2 hoạt động hơn.

Theo cách khác, thế oxy hóa khử của dung dịch S2 nằm trong khoảng từ 300 đến 450 mV, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 360 đến 410mV.

Các molybden Mo(VI) oxit trong dung dịch nước và ở độ pH để tổng hợp hỗn hợp theo sáng chế có thể tồn tại trong các cấu trúc phân tử khác nhau: MoO_4^{2-} và $[\text{MoO}_6]^{2-}$, $[\text{Mo}_2\text{O}_3(\text{O}_2)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{2-}$, mà còn ở dạng đa nhân hoạt động (như cấu trúc phức chất hai nhân oxo-Mo(VI) (Dement'ev I.A. et al (2007) "Mononuclear, polynuclear, and cluster complexes of molybdenum và their reactions as models of biochemical systems and processes", *Russ. J. Gen. Chem.*, 77(5), 822-843)).

Có lợi, nếu điều kiện điều chế cho phép tạo ra *tại chỗ* peroxo- và hydro-peroxomolybdat khi muối kim loại được sử dụng là muối molybden. Loại thứ hai là loại $[\text{Mo}_2\text{O}_3(\text{O}_2)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{2-}$. Theo cách khác, lượng mol của hydro peroxit dư hơn gấp 1000 lần, và của muối kim loại, và cụ thể là hơn gấp 10.000 lần, và còn tốt hơn nữa là 15.000 lần, so với Mo(VI) được ưu tiên.

Có lợi, nếu (các) chất càng hóa cũng như độ pH khi tổng hợp sẽ hạn chế sự thay đổi phản ứng loại « bộ khử Jones » bao gồm việc khử ion metalat, có lợi nếu tức là Molybdat, thành trạng thái oxy hóa thấp tương ứng với kim loại molybden. Theo cách khác, sự thay đổi này bị hạn chế trong môi trường nước có độ axit yếu, thông thường có độ pH nằm trong khoảng từ 4,4 đến 5,0, và ví dụ, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 4,7.

Tốt hơn, nếu khi một vài chất càng hóa có mặt, thì các dung dịch độc lập chứa chất càng hóa được tạo ra, mỗi dung dịch này chứa chất càng hóa cụ thể.

Theo phương án được ưu tiên khác, việc bổ sung chất càng hóa được tiến hành theo trình tự làm tăng độ pKa.

Ví dụ, một mặt có thể điều chế dung dịch chứa chất càng hóa loại BAPTA và mặt khác cũng có thể điều chế dung dịch chứa chất càng hóa loại EGTA. Tốt hơn, nếu BAPTA được bổ sung vào và sau đó, bổ sung EGTA.

Có lợi, nếu (các) chất càng hóa có tác dụng *tại chỗ*, tức là đặc biệt sau khi dùng khu trú, phản ứng Fenton-Haber-Weiss với đặc biệt là hằng số phân ly $K_{d\text{càng hóa}}$: $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} > \text{Ca}^{2+}$.

Có lợi, nếu (các) chất càng hóa cho phép tự duy trì sự tạo ra gốc hoạt động ngoại bào, chủ yếu là $\text{HOO}^{\bullet}$ và rất nhỏ $\text{O}_2^{\bullet}$ và $\text{HO}^{\bullet}$ tại chỗ.

Theo cách khác, trước tiên có thể bổ sung BAPTA vào dung dịch S2 để thu được dung dịch S3 thu được. Ví dụ, dung dịch S3 này có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4,3 đến 4,8. Ví dụ, dung dịch S3 có thể oxy hóa khử về cơ bản là giống so với dung dịch S2. Mặt khác, thế oxy hóa khử không bị thay đổi trong quá trình bổ sung chất càng hóa loại BAPTA. Theo cách khác, thế oxy hóa khử của dung dịch S3 nằm trong khoảng từ 250 đến 450 mV, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 300 đến 400mV. Có lợi, nếu việc hòa tan sơ bộ BAPTA với thể tích nhỏ dung dịch S2 được tiến hành trước khi cho nó tiếp xúc với phần còn lại của dung dịch S2.

Tốt hơn, nếu nồng độ BAPTA có tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1/1 đến 1/3 và tốt hơn là 1/2, tính theo lượng muối molybden.

Ví dụ, dung dịch S3 có nồng độ hydro peroxit nằm trong khoảng từ 250 đến 500 mM, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 320 đến 440 mM.

Có lợi, nếu có thể bổ sung ít nhất một chất càng hóa khác loại EGTA vào dung dịch S3 để thu được dung dịch S4 thu được. Theo cách khác, dung dịch S4 có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4,3 đến 4,7. Theo cách khác, thế oxy hóa khử của dung dịch nằm trong khoảng từ 300 đến 400 mV, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 350 đến 390 mV.

Tốt hơn, nếu nồng độ của EGTA có tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 10/1 đến 50/1 và tốt hơn là khoảng 25/1, tính theo lượng muối molybden.

Ví dụ, dung dịch S4 có nồng độ hydro peroxit nằm trong khoảng từ 250 đến 550 mM, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 320 đến 470 mM.

Theo cách khác, độ pH ở bước (viii) được điều chỉnh bởi dung dịch bazơ, ví dụ, loại natri hydroxit, tốt hơn được cô, ví dụ tới nồng độ nằm trong khoảng từ 8 đến 15 M. Có lợi, nếu độ pH ở bước (viii) có thể được điều chỉnh đến trị số nằm trong khoảng từ 4,4 đến 5,0, và tốt hơn là khoảng 4,6.

Theo cách khác, độ pH của hỗn hợp theo sáng chế nằm trong khoảng từ 4,50 đến 4,70. Có lợi, nếu thế oxy hóa khử của hỗn hợp theo sáng chế nằm trong khoảng từ 320 đến 390 mV.

Theo phương án được ưu tiên khác, phương pháp bao gồm việc làm giảm thế oxy hóa khử ở bước (vi). Ví dụ, mức giảm thế oxy hóa khử có thể nằm trong khoảng từ 50 đến 150 mV, và thông thường là khoảng 90 mV.

Tốt hơn, nếu thế oxy hóa khử về cơ bản là không đổi theo mức giảm thế oxy hóa khử ở bước (vi).

Có lợi, nếu hỗn hợp theo sáng chế là ổn định theo thời gian trong quá trình bảo quản, ví dụ, ở nhiệt độ trong phòng hoặc nhiệt độ lên tới 45°C trong sáu tháng. Nên giữ hỗn hợp này trong bóng tối và tránh xa nơi ẩm.

Độ pH được đo bằng máy đo pH đã được hiệu chuẩn và bù nhiệt, cùng với điện cực kết hợp KCl 4M/AgCl.

Thế oxy hóa khử được đo cùng với máy đo độ pH/máy đo thế oxy hóa khử kết hợp, được gắn điện cực platin/calomen đã được hiệu chuẩn. Thông thường, việc đo này được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng, tức là 20°C và ở áp suất môi trường, tức là 101325 Pa.

Tốt hơn, nồng độ hydro peroxit được đánh giá trong các dung dịch nêu trên bằng cách đo quang phổ UV theo đẳng thức từ định luật Beer-Lambert: $A_{240\text{nm}} = 43,6 \times l \times [\text{H}_2\text{O}_2]$ với l tính theo xentimet và $[\text{H}_2\text{O}_2]$ tính theo mol (Noble R.W. et al (1970) "The reaction ferrous of ferrous horseradish peroxidase with hydrogen peroxide", *J. Biol. Chem.*, 245(9), 2409-2413).

Theo phương án cụ thể khác, hợp chất peroxo-kim loại của dung dịch S1 là hợp chất peroxo-molypden.

Do đó, theo phương án khác này hỗn hợp theo sáng chế chứa hợp chất peroxo kim loại. Theo phương án được ưu tiên khác, hỗn hợp theo sáng chế chứa phức chất peroxomolypden.

Theo cách khác, dung dịch chứa natri molybdat ở dạng Mo(VI). Có lợi, nếu ở độ pH của các dung dịch theo sáng chế, muối chủ yếu ở dạng xúc tác $\text{MoO}_3\text{-BAPTA}^{3-}$ và chủ yếu ở dạng $\text{MoO}_3\text{-EGTA}^{3-}$, là hai nguồn hoạt chất MoO_4^{2-} .

Theo phương án cụ thể, hỗn hợp theo sáng chế chứa muối, tốt hơn là natri, of molypden, hỗn hợp chứa hai chất càng hóa, tốt hơn là loại BAPTA và EGTA, hydro peroxit và chất đệm axetat (axit axetic/natri axetat chẳng hạn).

Theo phương án cụ thể khác, hỗn hợp theo sáng chế chứa:

- Molybdat muối, và ví dụ Natri molybdat;
- BAPTA;
- EGTA;
- H_2O_2 ;

- $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$;
- $E_{\text{oxy hóa khử}}$ nằm trong khoảng từ 250 đến 550 mV, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 300 đến 450 mV, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 300 đến 420mV;
- Độ pH = 4,4 – 5,0.

Theo phương án cụ thể khác, hỗn hợp theo sáng chế bao gồm:

- Molybdat muối, và ví dụ, natri molybdat;
- Muối lantan, và ví dụ, Lantan nitrat;
- BAPTA;
- EGTA;
- H_2O_2 ;
- $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$;
- E thế oxy hóa khử nằm trong khoảng từ 250 đến 550 mV, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 300 đến 450 mV, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 300 đến 420mV;
- độ pH 4,4 - 5,0.

Có lợi, nếu các hợp chất của hỗn hợp với lượng cần thiết và các điều kiện về độ pH và các điều kiện về thế oxy khử để tạo ra phức chất peroxomolybdat hoặc phức chất hydro-peroxomolybdat trong đó molybden có hóa trị VI.

Theo một phương án cụ thể, hỗn hợp theo sáng chế chứa ít nhất một chất càng hóa và tốt nhất và ít nhất hai chất càng hóa, và tốt hơn là với nồng độ lần lượt nằm trong khoảng từ 5 đến 20 μM và nằm trong khoảng từ 200 đến 700 μM .

Theo một phương án cụ thể, hỗn hợp theo sáng chế chứa chất cho gốc chính với lượng nằm trong khoảng từ 340 mM đến 450 mM tương tự H_2O_2 .

Cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm theo sáng chế ở dạng dược phẩm, chế phẩm này chứa ít nhất một muối kim loại, kim loại này được chọn từ molybden (Mo), vonfram (W), vanadi (V), vàng (Au), dãy lantanoid, cụ thể là lantan; ít nhất một chất cation hóa; và nguồn chứa gốc peroxit hóa. Chế phẩm này theo sáng chế là hữu ích trong phương pháp điều trị bệnh.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh bao gồm việc cho đối tượng cho nhu cầu dùng, có lợi nếu dùng khu trú, lượng hữu hiệu trị liệu của dược phẩm theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến quy trình bào chế dược phẩm theo sáng chế để dùng trong phương pháp điều trị bệnh.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa hoặc bao gồm hỗn hợp theo sáng chế.

Do đó, sáng chế đề cập đến dược phẩm dùng khu trú, khác biệt ở chỗ, dược phẩm này chứa hỗn hợp có hoạt tính điều trị, như được xác định theo sáng chế, hoặc có thể thu được theo phương pháp như được xác định theo sáng chế.

Có lợi, nếu dược phẩm theo sáng chế chứa hỗn hợp có hoạt tính dược lý với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 5 mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 2 mM, và còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,02 đến 1 mM.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến dược phẩm dùng khu trú theo sáng chế để dùng trong phương pháp điều trị bệnh nhiễm virus, và cụ thể là kể cả virus thuộc họ *Herpesviridae*.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến dược phẩm dùng khu trú theo sáng chế để dùng trong phương pháp điều trị bệnh nhiễm kể cả HSV-1 và/hoặc HSV-2.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến được phẩm dùng khu trú theo sáng chế để dùng trong phương pháp điều trị bệnh kháng viêm.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến được phẩm dùng khu trú theo sáng chế để dùng trong phương pháp phòng hoặc chữa bệnh.

Sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa molybden, ít nhất một chất càn hóa và nguồn chứa gốc peroxit hóa để dùng trong phương pháp điều trị ecpet. Chế phẩm này được xác định theo phương án bất kỳ trong số các phương án, các phương án khác, ưu điểm, phương án ưu tiên, hoặc ví dụ của sáng chế, ở dạng riêng lẻ hoặc dạng kết hợp bất kỳ trong số các dạng kết hợp của chúng.

Thuật ngữ « theo sáng chế » được dùng để chỉ phương án bất kỳ trong số các phương án, các phương án khác, ưu điểm, phương án ưu tiên, hoặc ví dụ của sáng chế, ở dạng riêng lẻ hoặc dạng kết hợp bất kỳ trong số các dạng kết hợp của chúng.

Thông thường, được phẩm dùng khu trú theo sáng chế chứa các tá được và cụ thể là các tá được được phê chuẩn trong được điển.

Điều trị chống lây nhiễm có nghĩa là bao gồm cả việc phòng bệnh, phòng bệnh và chữa bệnh, ví dụ, hạn chế sự lây nhiễm trong trường hợp tiếp xúc với nguồn lây bệnh, mắc bệnh, pha cấp tính của nó với, điều trị triệt để một phần hoặc không có nguyên nhân và/hoặc hạn chế sự lan tràn của bệnh.

Có lợi, nếu hỗn hợp có hoạt tính hoặc được phẩm theo sáng chế có tác dụng *tại chỗ* trong khi dùng nó.

Có lợi, nếu hỗn hợp có hoạt tính hoặc được phẩm theo sáng chế có tác dụng khi dùng qua biểu mô và tốt hơn là không dùng hoặc chỉ dùng hạn chế qua da.

Có lợi, nếu hỗn hợp có hoạt tính hoặc được phẩm theo sáng chế bị khử hoạt tính khi dùng qua da.

Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa nó được dùng khu trú ở xoang miệng.

Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa nó được dùng khu trú ở bộ phận sinh dục hoặc hậu môn.

Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa nó được dùng khu trú trên da.

Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa nó được dùng khu trú trên niêm mạc.

Theo cách khác, các tá dược được phê chuẩn bởi Dược điển châu Âu (Ph. Eur.), Dược điển quốc gia (USP, JP, IP, Ph. Helv., Ph. Belg., độ pH Fr., BP, DAB, ÖAB, đặc biệt) và Dược điển quốc tế (Ph. Int.; WHO), có thể được đưa vào trong quá trình sản xuất hỗn hợp theo sáng chế và/hoặc vào “hỗn hợp” như được nêu ở “Hỗn hợp 1”.

Hỗn hợp và chế phẩm theo sáng chế là đặc biệt thích hợp để tạo ra dược tính ở người.

Có lợi, nếu hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế có thể dùng cho các phản ứng loại Fenton-Haber-Weiss và loại « tương tự » Fenton-Haber-Weiss, và tốt hơn là tạo ra gốc $\text{HO}_2^\bullet$ và lượng nhỏ các gốc $\text{O}_2^\bullet$, $\text{HO}^\bullet$.

Theo các tác giả sáng chế, tính thấm của các chất hoạt động $\text{HOO}^\bullet$, là đủ để gây chết tế bào theo chương trình theo cách giới hạn và có kiểm soát.

Theo các tác giả sáng chế, tính thấm của các chất hoạt động $\text{HOO}^\bullet$, là đủ để tác dụng chống sao chép virus theo cách hữu hiệu và có kiểm soát.

Theo sáng chế, tốt hơn, nếu thế oxy hóa khử của hỗn hợp theo sáng chế được sử dụng để hạn chế trong phạm vi hẹp, các nồng độ của các tiền chất của gốc hoạt chất sao cho để tạo ra trạng thái cân bằng ổn định giữa: tác dụng chống sao chép/tác dụng

gây độc tế bào nhẹ đối với tế bào khỏe mạnh/tác dụng gây độc tế bào đáng kể đối với tế bào đã nhiễm virus/tác dụng phòng sự lây nhiễm.

Có lợi, nếu hỗn hợp có hoạt tính điều trị hoặc có hoạt tính được lý theo sáng chế có khả năng tạo ra chủ yếu và ưu tiên các gốc hoạt động $\text{HOO}^\bullet$.

Do đó, theo sáng chế, canxi ngoại bào *in vivo* là yếu tố kích hoạt chính để sản xuất $\text{HOO}^\bullet$. Ví dụ, đây là tác dụng chủ yếu của phức chất $2\text{Mo}_{(\text{VI})}\text{-BAPTA}_2(\text{H}_2\text{O}_2)$ khi muối molybden và BAPTA có mặt trong hỗn hợp theo sáng chế. Ví dụ, đây là tác dụng chủ yếu của phức chất $2\text{Mo}_{(\text{VI})}\text{-EGTA}_2(\text{H}_2\text{O}_2)$ khi muối molybden và EGTA có mặt trong hỗn hợp theo sáng chế.

Có lợi, nếu quá trình sản xuất trong môi trường ngoại bào chứa $\text{HOO}^\bullet$ cho phép cải biến ngoại bào (oxy hóa các gốc axit amin ngoài màng chẳng hạn), từ đó có thể hạn chế được bệnh nhiễm virus bằng cách cải biến sự nhận diện tế bào.

Có lợi, nếu quá trình sản xuất trong môi trường ngoại bào $\text{HOO}^\bullet$ cũng như khả năng thâm tế bào của nó là tương hợp với thời hạn sử dụng dài của nó (≥ 1 giây) và khả năng thâm thấu mạnh tế bào của nó với $\text{OH}^\bullet$ hoặc $\text{O}_2^\bullet$ (1ms và mức độ thâm thấu khoảng 1 nm). Có lợi, nếu chất này $\text{HOO}^\bullet$ liên quan tới phản ứng Haber-Weiss và phản ứng Fenton (« tương tự » hoặc không tương tự) ở mức độ ngoại bào và nội bào và cho phép tự duy trì sau đó.

Có lợi, nếu hỗn hợp chứa $\text{Mo}(\text{IV})$ theo sáng chế có độ pH nằm trong khoảng từ 4,4 đến 5,0. Điều này đặc biệt cho phép tối ưu hóa hằng số tốc độ k_{obs} ($\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) của quá trình phân hủy $\text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2^\bullet$.

Có lợi, nếu việc cải biến thể oxy hóa khử nội bào bằng cách cho tiếp xúc với chế phẩm theo sáng chế cho phép đạt trạng thái cân bằng hiện tượng gây chết tế bào theo chương trình/chống gây chết tế bào theo chương trình. Cụ thể hơn, trạng thái cân bằng gây chết tế bào theo chương trình/chống gây chết tế bào theo chương trình đặc biệt tùy thuộc vào sự tồn tại của bệnh nhiễm virus HSV và chủ yếu là HSV-1 và -2.

Theo cách khác, hỗn hợp theo sáng chế có hoạt tính một cách chọn lọc trên các tế bào đã nhiễm HSV và chủ yếu là nhiễm HSV-1 và -2.

Do đó, tồn tại trạng thái cân bằng ổn định giữa các mức ứng suất gây ra bởi sự lây nhiễm HSV, bao gồm dòng canxi và quá trình điều hòa chết theo chương trình.

Trạng thái cân bằng này bị nhiễu loạn bởi sự có mặt của các gốc trong bào chất và việc cải biến của thế oxy hóa khử tế bào. Điều này gây ra mức ứng suất tế bào tương tự như bệnh nhiễm virus bởi HSV, dòng canxi tương tự và gây cảm ứng tương tự của con đường trao đổi chất, các con đường tương tự này sẽ điều hòa ngược đối với trạng thái cân bằng chống gây chết tế bào theo chương trình khác. Điều này có tác dụng hỗ trợ tác dụng điều trị của hỗn hợp theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa nó.

Theo cách khác, dược phẩm hoặc hỗn hợp theo sáng chế được sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh ecpet ở môi và xoang miệng.

Theo cách khác, dược phẩm hoặc hỗn hợp theo sáng chế được sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh ở bộ phận sinh dục và hậu môn ecpet.

Theo một phương án, hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế có tác dụng chống lây nhiễm (tác dụng làm dịu đến nhẹ đối với virus, các thụ thể virus ở tế bào làm chất dự trữ), chống nhận diện và tương tác nội phân tử (tác dụng đáng kể, thụ thể tế bào đối với virus). Các hiệu quả này là nằm bên ngoài tế bào và hạn chế tính lây nhiễm virus. Do đó, hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế có tác dụng phòng bệnh. Từ đó, hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế có tác dụng chống lây nhiễm.

Theo cách khác, dược phẩm hoặc hỗn hợp theo sáng chế được sử dụng trong điều trị quần thể biểu hiện HSV ở dạng bao, sao chép hoặc lây nhiễm.

Theo cách khác, dược phẩm theo sáng chế hoặc hỗn hợp được sử dụng trong việc điều trị bệnh quần thể tế bào hoặc biểu hiện mô HSV-1 (Kessler H.H. et al (2000) "Detection of *Herpes Simplex* Virus DNA by real-time PCR", J Clin Microbiol., 38(7), 2638-2642).

Theo cách khác, dược phẩm theo sáng chế hoặc hỗn hợp được sử dụng trong a điều trị bệnh of a quần thể tế bào hoặc of a biểu hiện mô HSV-2 (Kessler H.H. et al (2000) "Detection of *ecpet thông thường* Virut ADN by real-time PCR", J Clin Microbiol., 38(7), 2638-2642).

Có lợi, nếu hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế có hiệu quả chống sao chép do trên thực tế việc tiếp xúc sơ bộ của bệnh nhiễm virus với tế bào hoặc mô khỏe mạnh. Hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế có thể được sử dụng để phòng bệnh nhiễm virus bằng cách hạn chế sự sao chép virus nội bào và/hoặc bằng cách hạn chế sự thâm thấu virus vào tế bào.

Có lợi, nếu hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế có hiệu quả chống sao chép ưu tiên đối với quá trình chuyển hóa tế bào nhiễm bệnh (con đường ứng suất oxy hóa và các kênh canxi). Hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế có thể được sử dụng cụ thể dùng để tác dụng trực tiếp chống lại sự sao chép virus nội bào và chống lại sự lây nhiễm quá mức bởi HSV-1 và/hoặc HSV-2 của mô đã nhiễm bệnh tương tự hoặc mô khỏe mạnh nằm gần mô nhiễm bệnh.

Theo cách khác, hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế gây ức chế khác loại sự sản xuất interleukin-6 (IL-6) của vật ghép trên da người và do đó, có hiệu quả chống viêm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 – Ví dụ về hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế

Ví dụ được thực hiện bởi muối molybden. Chế phẩm có công thức theo bảng 1 ("Hỗn hợp 1"), được biểu thị bằng nồng độ ban đầu của các thành phần được điều chế:

Bảng 1

Các hợp phần	Hỗn hợp theo sáng chế
Natri molybdat	20,7 μ M
BAPTA	12,6 μ M
EGTA	526 μ M
H ₂ O ₂	353mM
CH ₃ COOH/CH ₃ COONa	70mM
Ph (with NaOH)	4,4 – 5,0
E ^o _{oxy hóa khử}	300 đến 420Mv

Chế phẩm này được gọi là chế phẩm « ban đầu » do nó tương ứng với các nồng độ của các chất phản ứng đã được bổ sung mà không liên quan tới quy trình xúc tác đã dùng.

Toàn bộ các thành phần được sử dụng để tổng hợp cũng như thành phẩm được kiểm định bởi phổ IR-FT của chúng.

Bảng 1a

Sản phẩm	Độ tinh khiết	Công thức thô	Số CAS
Natri molybdat dihydrat	98-103%	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10102-40-6
BAPTA : (axit 1,2-bis(o-aminophenoxy)etan- <i>N,N,N',N'</i> -tetraaxetic)	$\geq 98\%$	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	85233-19-8
EGTA: (axit etylen glycol-bis(2-aminoetylete)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraaxetic)	$\geq 99\%$	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	67-42-5
Hydro peroxit	29-31%	H_2O_2	722-84-1
Axit axetic băng	99,8-100,5%	CH_3COOH	64-19-7
Natri axetat trihydrat	99-101%	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5010524
Natri hydroxit	10N	NaOH	1310-73-2
Nước mềm	1 μS	H_2O	7732-18-5

Các phép đo biểu thị bằng hình vẽ được tiến hành trong và sau khi tổng hợp là trị số trung bình từ 3 lần tiến hành.

Lượng được nêu dưới đây để điều chế một lít hỗn hợp 1.

A – BƯỚC (i): Điều chế dung dịch đệm (dung dịch BS)

CH_3COOH (100%; δ : 1,05g.cm⁻³ (lỏng, 20 °C)) 4,0mL (nồng độ cuối 70mM)

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

Nước qsp 1L

Kiểm tra độ pH: 4,7-4,8

Nhiệt độ trong phòng (20°C)

B – BƯỚC (ii): Điều chế dung dịch phức chất kim loại (dung dịch CS)

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (nguồn Mo(VI); 100%) 200 mg (dung dịch cuối 2,4mM)

Nước vừa đủ 340ml

Khuấy nhẹ, nhiệt độ trong phòng

C – BƯỚC (iii): Điều chế dung dịch ban đầu (Si1)

Nước 900mL

CH_3COOH (100%) 4mL (70mM)

Bổ sung rất chậm và khuấy rất nhẹ (250vòng/phút),

pH: 2,9-3,8

$E_{\text{oxy hóa khử}}$: 470-490mV

và Sau đó,

H_2O_2 (30%) vừa đủ để nồng độ cuối là 1,2% tính theo trọng lượng và theo các thử nghiệm sơ bộ

Ở 45 phút:

Độ pH: 2,70-2,90

$E_{\text{oxy hóa khử}}$: 440-460mV

Bởi phương trình Noble: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 380\text{-}410\text{mM}$ (Dung dịch Si1)

D – BƯỚC (iv): Điều chế dung dịch ban đầu (Si2)

Đưa « dung dịch BS » vào dung dịch Si1 12mL ($\approx 1\text{mM}$ axetat)

Bổ sung đồng thời khuấy nhẹ.

Ở 45 phút:

Độ pH: $\approx 2,90$

E_{oxy} hóa khử: 460-480mV

Bởi phương trình Noble: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 360\text{-}410\text{mM}$ (Dung dịch Si2)

E – BƯỚC (v): Điều chế dung dịch peroxomolybden S1

Đưa « dung dịch CS » vào dung dịch Si2 10mL

Ở 45 phút:

Độ pH: 2,80-3,00

E_{oxy} hóa khử: 450-480mV

Bởi phương trình Noble: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 370\text{-}400\text{mM}$ (Dung dịch S1)

F – BƯỚC (vi): Điều chế dung dịch S2

Điều chỉnh độ pH đồng thời khuấy nhẹ:

NaOH 9,9-10,1M 3,6mL = 0,9L của hỗn hợp 1

Độ pH 4,5-5,0

Ở 45 phút:

Độ pH: 4,60

E_{oxy} hóa khử: 380-390mV (Dung dịch S2)

G – BƯỚC (vii): Bổ sung chất càng hóa – điều chế dung dịch S4

Đưa BAPTA (98,8%) 6mg/L,

sau khi hòa tan rất chậm BAPTA đồng thời khuấy nhẹ từng phần chế phẩm S2 (1,4L) được tạo cân bằng trước ở 25°C (được gọi là dung dịch « S3.1 »).

Gộp dung dịch S3.1 với dung dịch S2 để tạo ra dung dịch S3,2.

Ở 45 phút:

Độ pH: 4,40-4,70

$E_{\text{oxy hóa khử}}$: 380-390mV

Bởi phương trình Noble: $[H_2O_2] = 370-390\text{mM}$

Đưa EGTA (99,1%) 200mg/L trong dung dịch S3,2 để tạo ra dung dịch
S4

Hòa tan đồng thời khuấy nhẹ.

Ở 45 phút:

pH: 4,40-4,60

$E_{\text{oxy hóa khử}}$: 380-390mV

Bởi phương trình Noble: $[H_2O_2] = 370-420\text{mM}$

H – BƯỚC (viii): Điều chỉnh độ pH

Điều chỉnh độ pH (NaOH 9,9-10,1M, tức là $\approx 400\text{g/L}$) $\Rightarrow$ độ pH: $4,60 \pm 0,2$

I – BƯỚC (ix): Điều chỉnh thể tích đối với dung dịch cuối (FS)

Điều chỉnh thể tích bằng nước mềm vừa đủ 1 lít

Ở 12-18 giờ:

Độ pH: 4,50-4,70

$E_{\text{oxy hóa khử}}$: 380-390mV

Bởi phương trình Noble: $[H_2O_2] = 350-380mM$

Bằng cách chuẩn độ: $[H_2O_2] = 400-430mM$

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

Hỗn hợp theo sáng chế, có sẵn để sử dụng, là ổn định trong bóng tối trong hơn 6 tháng ở nhiệt độ trong phòng hoặc ở 45°C.

Na hydro-peroxo-molypdat với nồng độ $24,3\mu\text{M}$ trong hỗn hợp cuối 1.

Ví dụ 2 – Dấu hiệu biến đổi thế oxy hóa khử

Dấu hiệu của hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế được đánh giá bằng sự thay đổi thế oxy hóa khử trong quá trình tổng hợp chế phẩm được điều chế theo Ví dụ 1.

Theo Fig. 1, thế oxy hóa khử $\approx 90\text{mV}$ ($\approx 380\text{mV}$) ở bước 6 (điều chỉnh độ pH bằng nước soda) được giảm so với dung dịch ban đầu ($\approx 470\text{mV}$; bước 3). Thế oxy hóa khử được giữ hằng định cho đến khi kết thúc quá trình tổng hợp (bước 9). Tiến hành tương tự đối với quá trình lão hóa chế phẩm của hỗn hợp theo sáng chế theo ví dụ 1 trong 6 tháng ở nhiệt độ trong phòng ($389\text{mV} \pm 5\text{mV}$) và ở 45°C ($389\text{mV} \pm 8\text{mV}$) đối với độ pH lần lượt là $4,56 \pm 0,40$ và $4,53 \pm 0,41$.

Ví dụ 3 – Dấu hiệu tiêu thụ và tạo ra H_2O_2 – tạo trạng thái cân bằng peroxo-chất phản ứng và thế oxy hóa khử của hỗn hợp 1.

Dấu hiệu của hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế được đánh giá bằng tiêu thụ và tạo ra H_2O_2 trong quá trình tổng hợp chế phẩm được điều chế theo ví dụ 1.

Theo Fig. 1, so với nồng độ H_2O_2 của dung dịch ban đầu (353mM; bước 3 đến 10), việc tạo ra peroxit bất ngờ ($\approx 42\text{mM}$; bao gồm phần nhỏ axit peraxetic) được quan sát do bổ sung H_2O_2 vào dung dịch đậm (axit axetic/axetat). Nếu việc bổ sung H_2O_2 không được tiến hành trong dung dịch nước đậm axit có sẵn (bước 3; độ pH = $2,84 \pm 0,1$), thì sẽ làm phân hủy nhanh và tùy ý chất này do độ pH quá cao (nước) (độ $\text{pK}_{\text{aH}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2} \approx 4,8$).

Từ bước 4 đến bước 7, việc tiêu thụ hạn chế H_2O_2 quan sát được ($10\text{mM} \pm 6\text{mM}$), cho tới khi làm ổn định nó với nồng độ $381\text{mM} \pm 5\text{mM}$ (bước 7; +BAPTA).

EGTA biểu thị trạng thái cân bằng peroxit (phản ứng “tương tự” Fenton) bằng cách làm thoái biến peroxit, tức là $393\text{mM} \pm 29\text{mM}$ ở bước 7, đến $357\text{mM} \pm 26\text{mM}$ ở bước 9, và $365\text{mM} \pm 15\text{mM}$ ở bước 9 + 12 giờ.

Ở bước 6, giọt đột ngột xuất hiện trong thế oxy hóa khử được quan sát (nằm trong khoảng từ $463\text{mV} \pm 15\text{mV}$ đến $392\text{mV} \pm 17\text{mV}$) bằng cách điều chỉnh độ pH được quan sát. Việc bổ sung (bước 7) chất càng hóa BAPTA và sau đó EGTA có tác dụng làm ổn định thế oxy hóa khử ($386\text{mV} \pm 5\text{mV}$ và $383\text{mV} \pm 6\text{mV}$) bằng cách làm ổn định trạng thái cân bằng hóa học.

Ví dụ 4 – Thử nghiệm hiệu quả oxy hóa khử của hỗn hợp theo sáng chế: phương pháp quercetin.

A – Dung dịch hoạt động

1 – Quercetin

Dung dịch chứa quercetin dihydrat (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on dihydrat, 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon dihydrat; ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ở 10^{-3} mol/L được điều chế trong metanol.

2 – Dung dịch clohydric

Dung dịch thứ nhất chứa axit clohydric 1M được điều chế trong metanol. Dung dịch thứ hai được điều chế ở 0,3 M trong metanol. Dung dịch hoạt động được điều chế bằng cách bổ sung 343 μ l dung dịch 1M đến 1,357 μ l của dung dịch 0.3M.

3 – Các dung dịch Fe³⁺ (so sánh)

Dung dịch chứa Fe³⁺ (Fe₂(SO₄)₃.xH₂O) ở 2 mg/ml được điều chế trong nước HPLC. Sau đó, nó được pha loãng để thu được tám dung dịch so sánh ở: 20, 100, 200, 300, 400, 500, 1,000 và 1,500 μ g/ml. Các dung dịch này cuối cùng được pha loãng 20 lần trong huyết tương của người hoặc trong nước HPLC để cuối cùng thu được các nồng độ: 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 và 75 μ g/ml.

4 – Các dung dịch Fe²⁺ (toán đồ so sánh, đối chứng hoạt tính)

Dung dịch chứa Fe²⁺ (FeSO₄.7H₂O) ở 89 mg/ml được điều chế trong nước HPLC. Sau đó được pha loãng để thu được ba dung dịch so sánh ở: 0,445, 4,45 và 44,5 mg/ml. Cuối cùng, các dung dịch này được pha loãng 10 lần trong nước HPLC để cuối cùng thu được các nồng độ: 0, 0,0445, 0,445 và 4,45 mg/ml.

B – Thử nghiệm bằng phương pháp quercetin

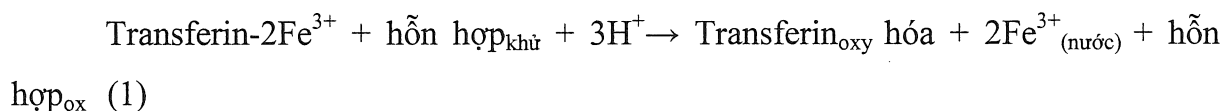
Sự có mặt của Fe³⁺ (toán đồ) hoặc quá trình tạo ra (Fe²⁺ toán đồ và hiệu quả của hỗn hợp theo sáng chế sau khi 2 phút tiếp xúc) được xác định bằng phương pháp quercetin.

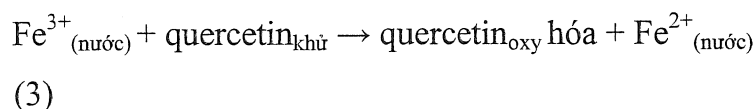
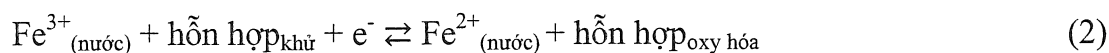
Theo các điều kiện phân tích hoặc sử dụng của hỗn hợp 1:

“hỗn hợp_{oxy hóa}” được dùng để chỉ hỗn hợp theo sáng chế làm chất oxy hóa.

“hỗn hợp_{khử}” được dùng để chỉ hỗn hợp theo sáng chế làm chất khử.

Quá trình tạo ra Fe³⁺ là như sau:





Phản ứng (1) xảy ra trong môi trường huyết tương.

Phản ứng (2) xảy ra trong môi trường huyết tương hoặc trong nước HPLC và tương ứng với trạng thái cân bằng của phản ứng Fenton-Haber-Weiss.

Phản ứng (3) là phản ứng oxy hóa quercetin để đánh giá thế oxy hóa khử của hỗn hợp 1.

Trong môi trường axit và ở 70°C, quercetin được oxy hóa đặc hiệu bởi sắt III (Fe^{3+} ; El Hajji et al 2006 and Balcerzak et al, 2008) bởi transferin trong môi trường huyết tương và không được oxy hóa bởi sắt II (Fe^{2+}). Ion Fe^{3+} được hòa tan trong các điều kiện này.

30 μl dung dịch quercetin được bổ sung đến 170 μl dung dịch clohydric hoạt động. Sau khi đồng nhất hóa, 50 μl mẫu (Fe^{3+} trong huyết tương của người hoặc trong nước HPLC, Fe^{2+} trong nước HPLC, hỗn hợp theo sáng chế sau khi 2 phút tiếp xúc với huyết tương của người) được bổ sung. Các dung dịch được khuấy mạnh và nhanh và sau đó được ủ trong thời gian 1h ở 70°C. Sau khi ủ, các mẫu được ly tâm trong 15 phút ở 14.000 vòng/phút và ở nhiệt độ trong phòng. 100 μl dịch nổi trên bề mặt được lấy làm mẫu. Phổ UV của mỗi mẫu thu được ở bước sóng nằm trong khoảng từ 230 đến 500 nm. Mẫu trống: nước, Fe^{2+} , Fe^{3+} , huyết tương được lấy ra theo loại thử nghiệm. Phổ hấp thụ của quercetin đã được oxy hóa bởi Fe^{3+} đã được tạo ra từ transferin huyết tương và phản ứng Fenton-Haber-Weiss *tại chỗ* được giữ lại (nằm trong khoảng từ 285-305 nm).

Đỉnh của đường cong được tập trung ở 292 nm khi thử nghiệm được tiến hành trong nước HPLC hoặc trong huyết tương. Nó có thể được dịch chuyển tối đa 10 nm khi mẫu trắng thử nghiệm được lấy ra.

1 – Toán đồ Fe^{3+}

Toán đồ đối với ion Fe(III) được tạo ra, ví dụ, bằng cách đo độ hấp thụ UV (nằm trong khoảng từ 250 đến 330nm) của quercetin đã được oxy hóa đối với các nồng độ Fe^{3+} khác nhau (tham khảo khoảng Fe^{3+} nêu trên) trong huyết tương của người, và bằng cách thông báo tỷ trọng quang học theo bước sóng.

Từ phổ của khoảng 250-330 nm, diện tích dưới đường cong (AUC) nằm trong khoảng từ 285 đến 305 nm được tính toán theo công thức:

$$AUC_{285nm}^{305nm} = \int_{285nm}^{305nm} f(x)dx = \int_{285nm}^{305nm} \text{Độ hấp thụ } d(\lambda)$$

Do đó, mỗi diện tích bề mặt của đỉnh 285-305nm đối với mỗi điểm của khoảng Fe^{3+} được minh họa bằng đồ thị. Đường cong xu hướng được minh họa bằng đồ thị (Excel), đẳng thức (hệ số tương quan R^2 đối với trị số gần nhất 1 làm hợp thức hóa thử nghiệm này) được giảm (Excel).

Nó có thể là dạng tuyến tính hoặc dạng đa thức: $y = ax^2 + bx + c$. Bằng cách thử nghiệm, mối tương quan này có thể có dạng $y = -0,0021x^2 + 0,4819x + 0,4521$; $R^2 = 0,9966$ (Fig. 2).

(4)

Đối với hỗn hợp theo sáng chế, nồng độ của dạng đương lượng Fe^{3+} tạo ra trong môi trường huyết tương hoặc từ Fe^{2+} phản ánh khả năng oxy hoá theo sáng chế và được tính toán từ đẳng thức (4). Đây là phương pháp gián tiếp để xác định hiệu quả oxy hóa khử của hỗn hợp 1 bằng cách thử nghiệm quercetin đã được oxy hóa bởi Fe^{3+} dưới ánh sáng tia cực tím UV. Do đó, nồng độ ở dạng « đương lượng » Fe^{3+} được đề cập. Hơn nữa, có thể so sánh thế oxy hóa khử của dung dịch theo sáng chế cần thử nghiệm, so với dung dịch so sánh theo sáng chế, mặt khác tiến hành so sánh với hiệu quả oxy hóa khử của hỗn hợp theo sáng chế.

2 – Toán đồ Fe^{2+}

Theo cùng cách như đối với ion Fe(III) , toán đồ được tạo ra đối với ion Fe(II) . Ví dụ, độ hấp thụ UV (230-500nm) của đỉnh quercetin được oxy hóa bởi Fe^{3+} thu được từ hỗn hợp theo sáng chế với nồng độ hoạt chất là $1,22\mu\text{M}$ ($250\mu\text{g/L}$) và 2 phút tiếp xúc với Fe^{2+} , ví dụ, được đo đối với khoảng nêu trên. Các phân tích toán học tương tự của AUC như mô tả đối với ion Fe(III) có thể được tiến hành.

3 – Thử nghiệm hiệu quả oxy hóa khử của hỗn hợp theo sáng chế, ví dụ, ở $1,22\mu\text{M}$ ($250\mu\text{g/L}$) hoạt chất MoO_4^{2-} .

Theo quy trình được mô tả trong B-, hiệu quả oxy hóa khử của hỗn hợp theo sáng chế ($1,22\mu\text{M MoO}_4^{2-}$ trong huyết tương của người) được thử nghiệm để: i) đánh giá khả năng lão hóa của nó ở nhiệt độ trong phòng và ở 45°C , ii) hợp thức hóa quá trình tạo ra nó và đánh giá so sánh các chế phẩm, iii) định lượng khả năng đi qua da của nó, iv) độ sinh khả dụng của nó và, v) pha sinh học của nó.

Theo đẳng thức (4), diện tích cụ thể của đỉnh hấp thụ UV được tính toán (ở dạng AUC) nằm trong khoảng từ 285 đến 305 nm của đỉnh quercetin được oxy hóa bởi Fe^{3+} tự do đã được tạo ra sau khi tiếp xúc với huyết tương trong 2 phút của hỗn hợp theo sáng chế (đẳng thức (1), (2) và (3)) với nồng độ cuối cùng cuối là $1,22\mu\text{M}$ với phức chất transferin- Fe^{3+} . Tính trung bình, sự sản xuất dạng đương lượng Fe^{3+} ($\text{Fe}^{3+}_{\text{đương lượng}}$) nằm trong khoảng từ 30 đến $50\mu\text{g/ml}$ huyết tương.

4 – Toán đồ dự đoán trong môi trường huyết tương của nồng độ hữu hiệu của hỗn hợp theo sáng chế

Sắt trong huyết tương không ở dạng tự do. Nó được gắn kết với transferin (hoặc siderophilin) ở dạng sắt III của nó (Fe^{3+}) với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 2 gốc/phân tử. Sắt ở dạng sắt II của nó (Fe^{2+}) không chu chuyển bên ngoài quá trình tạo phức chất của nó với hemoglobin. Nhận thấy rằng huyết tương của người được sử dụng không bị tan huyết. Phản ứng quercetin của hỗn hợp theo sáng chế với đồng trong huyết tương được coi là không đáng kể.

Khoảng nồng độ của hỗn hợp theo sáng chế (15,2, 7,6, 3,8 và 1,9 nM của MoO_4^{2-} cuối) được ủ trong huyết tương của người. Phản ứng với quercetin được tiến hành như được mô tả trong B-. Đỉnh hấp thụ cụ thể (chất nền chứa mẫu trắng huyết tương + quercetin) được lấy tích phân như được mô tả trong B-1 (Fig. 3).

Toán đồ được minh họa bằng đồ thị (Excel) ở dạng đa thức và đẳng thức xu hướng được tính toán ($y = 0,0144x^2 + 0,5863x + 0,4511$ với $R^2 = 0,9934$ (5); Fig. 4).

Mối quan hệ tỷ lệ (đẳng thức 5) được xác định giữa lượng sáng chế với nồng độ bổ sung vào huyết tương của người và lượng đương lượng Fe^{3+} (đẳng thức 4) được phát hiện bởi phản ứng oxy hóa của quercetin, tức là 28,95, 12,19, 3,97, 3,12 μg Fe^{3+} đương lượng/mL huyết tương của người, theo khoảng hỗn hợp theo sáng chế đã mô tả ở trên.

Ví dụ 5 – Đánh giá hiệu quả oxy hóa khử của sáng chế trên huyết tương của người

Sau khi bổ sung hỗn hợp theo sáng chế (Ví dụ 1 – Hỗn hợp 1”) vào huyết tương của người và sau thời gian tiếp xúc là 2 phút, tối đa nồng độ của MoO_4^{2-} là 0,03038 μM , phản ứng oxy hóa của quercetin để sản xuất Fe^{3+} thu được từ phức chất transferin huyết tương- Fe^{3+} và phản ứng Fenton-Haber-Weiss là tối ưu và tuyến tính (ví dụ tham khảo 4).

Sau khi chất nền mẫu trắng thử nghiệm, việc tăng nồng độ của sáng chế làm giảm quá trình tạo ra *tại chỗ* quercetin đã được oxy hóa bởi Fe^{3+} do thay đổi trạng thái cân bằng của phản ứng Fenton-Haber-Weiss ($\text{Fe}^{3+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$). Sau đó, nồng độ thử nghiệm cuối của MoO_4^{2-} là 0,00, 1,22, 4,05, 12,15, 24,30 và 30,38 μM (Fig. 5).

Ví dụ 6 – Hiệu quả chống sao chép

A – Mô hình

- Bốn mô hình tiếp xúc của hỗn hợp theo ví dụ 1 (“Hỗn hợp 1”) được thử nghiệm. Chúng bao gồm bốn khả năng sinh lý mà hỗn hợp 1 có thể thu được trong khi dùng để điều trị khu trú, tức là:

Mô hình 1: Hỗn hợp 1 trên các tế bào nhiễm HSV-1,

Mô hình 2: Hỗn hợp 1 trên các tế bào không nhiễm HSV-1,

Mô hình 3: Hỗn hợp 1 trên các tế bào không nhiễm và hỗn hợp 1 trên các tế bào không chứa HSV-1 (chưa bị lây nhiễm),

Mô hình 4: Hỗn hợp 1 trên HSV-1 trước khi nhiễm bệnh.

- Hai thời điểm tiếp xúc của hỗn hợp 1 được thử nghiệm, tức là 2 phút hoặc 1,5 phút, và sau đó loại bỏ hỗn hợp 1.

- Hai nồng độ của hỗn hợp 1 được thử nghiệm lần lượt là: 0,81 và 2,03 μM hoạt chất, tức là 167 và 417 $\mu\text{g/L}$.

- Phương pháp định lượng hiệu quả là qPCR (quantitative Polymease Chain Reaction; Mullis K. et al (1986) “*Specific Enzymatic Amplification of of DNA In Vitro: The Polymease Chain Reaction*”, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 51 (Pt 1), 263-273.)

- Hiệu quả chống sao chép (AE) của hỗn hợp 1 trên HSV 1 được đánh giá trong qPCR với các đoạn môi cụ thể của bộ gen của virus (Kessler H.H. et al (2000) “*Detection of Herpes simple virus DNA by real-time PCR*” J. Clin. Microbiol., 38(7), 2638-2642).

- Độ tính tế bào của hỗn hợp 1 (C) trên dòng BHK-21 được đánh giá trong qPCR với các đoạn môi cụ thể của gen của tiểu đơn vị ribosom nhỏ 18S (Texcell - Evry, France).

- Tính bội nhiễm (MOI): 1, tức là $5,10^5$ TCID₅₀ (Liều nhiễm khi nuôi cấy mô 50%).

- Thử nghiệm qPCR được tiến hành ở t0h (2h sau khi tiếp xúc giữa BHK-21 và HSV-1, và sau đó loại bỏ HSV-1), t2h- , t4h- và t8h-sau-nhiễm bệnh.

- Tỷ lệ AE/C sẽ thu được chỉ số hiệu quả *in vitro* (EI) của hỗn hợp 1 tương ứng với mô hình nghiên cứu.

Mô hình 1:

BHK-21 + HSV-1 (2h ; nhiễm bệnh) => rửa (PBS) để loại bỏ virus => các mẫu t0h => + Hỗn hợp 1 (2 phút) => rửa (môi trường nuôi cấy) để loại bỏ hỗn hợp 1 => ủ tế bào ở 37°C => mẫu t2h-, t4h- và t8h-sau nhiễm bệnh.

Mô hình 2:

BHK-21 + Hỗn hợp 1 (1,5 và 2 phút) => rửa (PBS) để loại bỏ hỗn hợp 1 => các tế bào + HSV-1 (2h; nhiễm bệnh) => rửa (môi trường nuôi cấy) để loại bỏ HSV-1 => mẫu t0h => ủ tế bào ở 37°C => mẫu t2h-, t4h- và t8h-sau nhiễm bệnh.

Mô hình 3:

BHK-21 + Hỗn hợp 1 (1,5 và 2 phút) => rửa (PBS) để loại bỏ hỗn hợp 1.

HSV-1 + Hỗn hợp 1 (1,5 và 2 phút) => rửa (PBS) để loại bỏ hỗn hợp 1.

Chế phẩm các tế bào và virus được tiếp xúc sơ bộ với Hỗn hợp 1 (2h ; nhiễm bệnh) => rửa (môi trường nuôi cấy) để loại bỏ HSV-1 => mẫu t0h => ủ tế bào ở 37°C => mẫu t2h-, t4h- và t8h-sau nhiễm bệnh.

Mô hình 4:

HSV-1 + Hỗn hợp 1 (2 phút) => rửa (PBS) để loại bỏ hỗn hợp 1 => + BHK-21 (2h ; nhiễm bệnh) => rửa (môi trường nuôi cấy) để loại bỏ HSV-1 => mẫu t0h => ủ tế bào ở 37°C => mẫu t2h-, t4h- và t8h-sau nhiễm bệnh.

B – Kết quả

Bảng 2: Giảm xuống 8 giờ quá trình nhân lên HSV-1 trên các tế bào BHK-21 sau khi tiếp xúc với hỗn hợp 1 (tính theo µg/L hoạt chất) hoặc axyclovir (ACV); chỉ số hiệu quả *in vitro* (EI).

Chất nền	Giảm mức độ sao chép HSV-1 ở t8h (%) [*]					EI ở t8h/mô hình ^{**}				
	Hỗn hợp 1		ACV	Hỗn hợp 1		Hỗn hợp 1		ACV	Hỗn hợp 1	
Thời gian tiếp xúc (phút)	2	2	2	1,5	1,5	2	2	2	1,5	1,5
Nồng độ (µg/L)	167	417	10 ³	167	417	167	417	10 ³	167	417
Mô hình 1	-97	-98	-12	NT	NT	37	48	2	NT	NT
Mô hình 2	-72	-96	-1	-70	-86	4	23	1	3	7
Mô hình 3	-93	-97	-6	-78	-90	14	35	1	4	10
Mô hình 4	-56	-69	-52 [#]	NT	NT	2	3	2 [#]	NT	NT

* Việc giảm mức độ sao chép HSV (RR) bởi các chất thử nghiệm (Hỗn hợp 1, axyclovir đối chứng) được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm và tương ứng với tỷ lệ định lượng qPCR của bộ gen HSV-1 và của độc tính tế bào mà được đánh giá bằng cách định lượng tiểu đơn vị 18S của tế bào chủ: $RR = \{ (100 \times ([HSV-1]_{\text{thử nghiệm}}/[18S]_{\text{thử nghiệm}})) / ([HSV-1]_{\text{đối chứng+}}/[18S]_{\text{đối chứng+}}) \} - 100$.

** Chỉ số hiệu quả chống sao chép *in vitro* (EI) của các chất thử nghiệm được thể hiện bởi $([HSV-1]/[18S])$ được đánh giá trong qPCR đặc hiệu của đối chứng dương tính đã nhiễm HSV ($[HSV-1]_{\text{đối chứng+}}/[18S]_{\text{đối chứng+}}$) so với các chất thử nghiệm (Hỗn hợp 1, axyclovir đối chứng): $EI = ([HSV-1]_{\text{đối chứng+}}/[18S]_{\text{đối chứng+}}) / ([HSV-1]_{\text{thử nghiệm}}/[18S]_{\text{thử nghiệm}})$.

[ACV]: 1 g/L

- EI tốt nhất (Bảng 2) thu được sau 2 phút tiếp xúc với hỗn hợp 1 và với nồng độ 417 $\mu\text{g/L}$. Cần lưu ý rằng thời gian tiếp xúc ảnh hưởng lớn tới EI (1,5 phút và 2 phút; các mô hình 2 và 3).

Các EI thu được theo *mô hình 1* và *3* trong thời gian tiếp xúc là 2 phút và nồng độ của hỗn hợp 1 là 167 $\mu\text{g/L}$, là đặc biệt đáng kể.

- Không liên quan tới mô hình, các EI thu được cùng với axyclovir (“ACV”) là không đáng kể (Bảng 2).

Bảng 3: Tỷ lệ phần trăm định lượng bởi qPCR (gen 18S hoặc HSV; ở 8h sau khi tiếp xúc trong 2 phút): i) nhân dòng BHK-21 (đối chứng: dòng không nhiễm bệnh) và, ii) khả năng sao chép HSV-1 (đối chứng: dòng nhiễm bệnh).

Gen/bộ gen	18S (%)						HSV (%)		
Đối chứng	Dòng + (PBS – HSV)			Dòng + (PBS + HSV)					
Chất thử nghiệm nền	Hỗn hợp 1		ACV (mg/L)	Hỗn hợp 1		ACV (mg/L)	Hỗn hợp 1		ACV (mg/L)
[hoạt chất]	167 µg/L	417 µg/L		167 µg/L	417 µg/L		167 µg/L	417 µg/L	
Mô hình 1	45	27	108	49	30	118 (1)	1	< 1	76 (1)
Mô hình 2	62	41	57 (1)	68	44	62 (1)	19	2	61 (1)
Mô hình 3	118	70	111	98	58	92 (1)	7	2	86 (1)
Mô hình 4	120	107	97	139	123	111	64	38	54
Thử nghiệm	1	2	3	4	5	6	7	8	9

- Đối với hỗn hợp 1 (với nồng độ nằm trong khoảng từ 167 đến 417 $\mu\text{g/L}$) hoặc ACV (với nồng độ 1 hoặc 10^3 mg/L), không liên quan đến đối chứng được sử dụng (dòng + PBS – HSV hoặc dòng + PBS + HSV), kết quả định lượng 18S được so sánh với mô hình tương tự (Bảng 3, thử nghiệm 1 đến 4, 2 với 5, 3 với 6).

- Đối với hỗn hợp 1, hiệu quả chống sao chép đáng kể phụ thuộc liều (Bảng 3, các thử nghiệm 7 và 8) được xác định đối với các mô hình 1, 2 và 3. Hiệu quả này không quan sát được đối với ACV (Bảng 3, thử nghiệm 9).

- Độc tính tế bào so sánh của hỗn hợp 1 (167 $\mu\text{g/L}$) và ACV (1mg/L) (Bảng 3) được lưu ý theo các mô hình 2 và 3 (Bảng 3, các thử nghiệm 1, 3, 4 và 6).

- Hiệu quả kháng HSV không có mặt (Bảng 2 và Bảng 3, thử nghiệm 9) đối với ACV (1 mg/L hoặc 1g/L) được lưu ý. Các mô hình đưa ra để nghiên cứu về hỗn hợp 1 không thể tương ứng với nghiên cứu liên quan tới ACV.

Đối với mô hình 1 (Hỗn hợp 1 đối với tế bào nhiễm bệnh):

- EI tốt nhất (Bảng 2) có hai nồng độ của hỗn hợp 1 (2 phút tiếp xúc, 167 và 417 $\mu\text{g/L}$, EI lần lượt là 37 và 48).

- Hỗn hợp 1 có hoạt tính trực tiếp (Bảng 2 và 3) đối với khả năng sao chép virus trong nhân, trên khả năng chuyển hóa tế bào.

- Hỗn hợp 1 có tính đặc hiệu tốt đối với tế bào đã nhiễm virus (Bảng 3, các thử nghiệm 4 và 5; mô hình 1 so với 2).

Đối với mô hình 2 (Hỗn hợp 1 đối với tế bào trước khi nhiễm bệnh):

- EI quan tâm (Bảng 2; tiếp xúc trong 2 phút và 417 $\mu\text{g/L}$, EI: 23).

- Hỗn hợp 1 có tác dụng trên tế bào mà kém nhạy với bệnh nhiễm virus và/hoặc có cơ chế không tương hợp với khả năng sao chép virus (Bảng 3, các thử nghiệm 7 và 8).

Đối với mô hình 3 (Hỗn hợp 1 trên: tế bào không nhiễm bệnh và HSV-1, riêng rẽ và trước khi tập hợp):

- EI quan tâm (Bảng 2) có hai nồng độ của hỗn hợp 1 (2 phút tiếp xúc, 167 và 417 $\mu\text{g/L}$, EI lần lượt là 14 và 35).

- Tùy thuộc vào liều được áp dụng (167 hoặc 417 $\mu\text{g/L}$) độc tính tế bào ở mức 0 (Bảng 3, thử nghiệm 4) hoặc độc tính tế bào hạn chế (Bảng 3, thử nghiệm 5) đối với hiệu quả kháng virus rất tốt (lần lượt ở Bảng 3, các thử nghiệm 7 và 8).

- Các tác giả sáng chế nhận thấy hiệu quả của hỗn hợp 1 có thể là sự tích lũy của *mô hình 2* có tác dụng đáng kể trên tế bào và *mô hình 4* có tác dụng hạn chế trên virus riêng rẽ (các Bảng 2 và 3).

Đối với mô hình 4 (Hỗn hợp 1 trên HSV-1):

- EI thấp (thời gian tiếp xúc: 2 phút, 167 và 417 $\mu\text{g/L}$, EI lần lượt là: 2 và 3; Bảng 2) được xác nhận khi không có mặt độc tính tế bào và khả năng sao chép virus đáng kể (Bảng 3, các thử nghiệm 8 và 9).

C – Kết luận

Trên dòng BHK-21, hiệu quả chính của hỗn hợp 1 là: i) có độc tính tế bào ưu tiên đối với tế bào đã nhiễm virus, ii) ức chế khả năng sao chép virus trên tế bào đã nhiễm virus và, iii) hạn chế khả năng nhiễm bệnh của tế bào khỏe mạnh.

Đích có thể là màng (các thụ thể đối với virus chẳng hạn) và/hoặc trao đổi chất (quá trình điều hòa ứng suất và con đường gây chết tế bào theo chương trình chẳng hạn).

Nhận diện virus và tương tác nội phân tử

Theo *mô hình 4*, hỗn hợp 1 có hiệu quả chống sao chép trực tiếp thấp ở virus. Trong các điều kiện thử nghiệm này, gần với việc sử dụng điều trị khu trú, sự quan sát này là tập trung vào sự biến đổi giới hạn của các thụ thể virus đối với tế bào: gB (HSV-2), gC (HSV-1), gD và gH/gL (HSV-1 và -2). Hỗn hợp 1 chỉ có thể làm thay đổi theo cách hạn chế các glycoprotein của virus bởi phản ứng *in vitro* Fenton-Haber-Weiss của nó.

Tương tự, các tác giả sáng chế không đưa ra ảnh hưởng đáng kể của hỗn hợp 1 đối với màng phospholipit của HSV mà có thể làm xáo trộn khả năng dung hợp và thấm qua màng.

Trong các điều kiện thử nghiệm này, hỗn hợp 1 không có hoạt tính diệt virus.

Khả năng sao chép virus và chuyển hóa tế bào:

Kỹ thuật qPCR sử dụng dịch phân giải tế bào ở 8h sau khi nhiễm bệnh. Mức giảm khả năng sao chép virus có thể thu được từ khả năng nhận diện kém và/hoặc tương tác nội phân tử và/hoặc khả năng sao chép (cải biến quá trình chuyển hóa tế bào gây ra bởi sự nhiễm bệnh và/hoặc hỗn hợp 1).

Nếu quá trình khử muối của virus được thay đổi bởi hỗn hợp 1 mà không làm thay đổi các quá trình khác và không liên quan đến mô hình, thì EI thu được có thể là nhỏ hơn nhiều do sự tích tụ bào chất của virion.

Theo *mô hình 2* (EI: 23 với 2 phút tiếp xúc và 417 µg/L), khả năng sao chép kém sau khi tiếp xúc sơ bộ tế bào với hỗn hợp 1 (Bảng 2 và Bảng 3, thử nghiệm 8) được quan sát.

Theo mô hình này, tế bào BHK-21 được tiếp xúc trong 2 phút với hỗn hợp 1. Thời gian tiếp xúc với HSV trong môi trường nuôi cấy hoàn toàn và tự nhiên dinh dưỡng là 2 giờ. Hỗn hợp 1 gây cải biến tế bào có thời hạn sử dụng kéo dài hơn 2 giờ và còn dự đoán được hiệu quả phòng bệnh của hỗn hợp 1.

Ngoài khả năng nhận diện HSV-1 bởi tế bào bị ảnh hưởng một phần bởi hỗn hợp 1 do tác dụng chằng chịt và hạn chế của nó trên virus glycoprotein gD (38% sao chép; Bảng 2), khả năng nhận diện này cũng có thể bị ảnh hưởng bởi tác dụng trên thụ thể tế bào với gD (HVEM và nectin) cũng như trên hai thụ thể tế bào bề mặt khác với gB và gH/gL là heparan sulfat và integrin.

Do quá trình thẩm thấu (cải biến khả năng thể oxy hóa khử nội bào hoặc qua màng, điều hòa con đường ứng suất oxy hóa), dòng canxi tế bào có thể được dịch

chuyển. Các dòng canxi tế bào hồi lưu này cũng xuất hiện do sự lây nhiễm HSV. Tuy nhiên, các dòng mới có thể khởi vận động ngay do đưa các chất cang hóa không thấm và tự do vào hỗn hợp 1 (hạn chế tế bào độc tính tế bào). Mặt khác, các cải biến tế bào chính khác không bị loại trừ và có thể tương ứng với quá trình oxy hóa hoặc khử protein (cầu xystein chẳng hạn) và cụ thể là các protein cấu trúc có thể xuất hiện quá trình nhập bào virus.

Theo *mô hình 3* (Bảng 2 và Bảng 3, các thử nghiệm 7 và 8), sự giảm đáng kể khả năng sao chép virus được quan sát (EI: 14 và 35 trong thời gian tiếp xúc là 2 phút, lần lượt là 167 và 417 $\mu\text{g/L}$).

Cả hai hiện tượng này đều xuất hiện. Hiện tượng thứ nhất là tác dụng giới hạn ở virus (*mô hình tham khảo 4*), hiện tượng thứ hai diễn ra chủ yếu ở tế bào (*mô hình tham khảo 2*).

Việc bổ sung các EI của *mô hình 2* và *4* (2 phút và 417 $\mu\text{g/L}$), tức là lần lượt là 23 và 3, sẽ thu được tổng (26) nhỏ hơn nhưng lại gần với kết quả thu được bằng thực nghiệm đối với *mô hình 3*, tức là 35.

Sự tích lũy tiềm tàng của i) quá trình nhận diện kém HSV và tế bào được dự tính và ii) quá trình tương tác nội phân tử được ức chế và/hoặc mức độ sao chép đặc biệt bằng cách thay đổi quá trình chuyển hóa tế bào.

Mô hình 1 (EI: 48 với 2 phút tiếp xúc và 417 $\mu\text{g/L}$) là mô hình phổ biến nhất.

Tác dụng của hỗn hợp kháng lây nhiễm 1 được ưu tiên trên tế bào hơn so với virus. Tác dụng này được thể hiện phổ biến nhất do tế bào đã bị nhiễm bệnh trước.

Trong mô hình này tương ứng với việc điều trị đạt hiệu quả nhất, nhận thấy rằng hỗn hợp 1 có hiệu quả được lý nội bào đặc hiệu chính. Đối với 417 $\mu\text{g/L}$ hoạt chất, bảng 3 thể hiện lượng các tiểu đơn vị ribosom 18S (tùy thuộc vào đối chứng được sử dụng, 27 và 30%, các thử nghiệm 2 và 5) trong mô hình này là nhỏ hơn so với *mô hình 2* (tùy thuộc vào đối chứng được sử dụng, 41 và 44%, các thử nghiệm 2 và 5) và trong *mô hình 3* (tùy thuộc vào đối chứng được sử dụng, 70 và 58%, các thử

nghiệm 2 và 5) là lý do về tính đặc hiệu của tế bào đã nhiễm virus so với tế bào khỏe mạnh.

Mục đích của hỗn hợp 1 trong mô hình này không thể nhận diện hoặc ơng tác nội phân tử, nhưng làm cải biến quá trình trao đổi chất thực sự. Sau đó nó được đặt ở trạng thái cân bằng mới, đặc biệt là do đi qua gốc màng gốc, việc cải biến thể oxy hóa khử của tế bào và sự có mặt của chất cang hóa bên ngoài, nằm giữa con đường ơng suất oxy hóa (gây ra bởi sự nhiễm bệnh), các dòng canxi (gây ra bởi nhiễm bệnh), ơng chế quá trình giải phóng phụ thuộc canxi của các virion, cải biến quá trình oxy hóa các protein trực tiếp hoặc gián tiếp liên quan đến khả năng sao chép virus.

Ví dụ 7 – Đánh giá sự sản xuất interleukin *ex vivo*

Sinh thiết da người không bị bệnh (8 mẫu sinh thiết và 4 người cho) bằng cách phẫu thuật để làm giảm trọng lượng được xử lý *ex vivo* với hỗn hợp 1 (5 mg/L hoạt chất; 2 phút). Các dịch nổi trên bề mặt trong đó các mẫu sinh thiết được tìm thấy được dùng làm mẫu ở 6h và 24h sau khi tiếp xúc để định lượng interferon- α (IFN- α ; inhibition of the infection with HSV; Mikloska Z. *et al* (2001) "Alpha và Gamma Interferon Inhibit Herpes Simplex Virus Type 1 Infection and Spread in Epidermal Cells after Axonal Transmission", *J. Virol.*, 75(23), 11821-11826), - β (IFN- β ; inhibition of HSV replication; Sainz Jr. B. *et al* (2002) "Alpha/Beta Interferon and Gamma Interferon Synergize To Inhibit the Replication of Herpes Simplex Virus Type 1", *J. Virol.*, 76(22), 11541-11550)) và interleukin 6 (IL-6; chất đánh dấu viêm).

Đối chứng thử nghiệm dương tính là dịch rửa giải sinh lý (NaCl 100mM).

Nồng độ cơ sở tế bào không bị cải biến của IFN- α và IFN- β được lưu ý.

Tùy thuộc vào các mẫu sinh thiết và người cho và do đó, đối với chấn thương khi phẫu thuật và thao tác thử nghiệm:

Sau 6h tiếp xúc (Fig. 6 và 7):

- với NaCl làm đối chứng, tạo ra IL-6 cơ bản là $277 \text{ pg/mL} \pm 11$ đến $2,866 \text{ pg/mL} \pm 206$.

- với hỗn hợp 1, khả năng ức chế IL-6 tạo ra so với đối chứng NaCl, nằm trong khoảng từ 0 pg/mL đến $1,015 \text{ pg/mL} \pm 17$.

Sau 24h tiếp xúc (Fig. 6 và 7):

- với NaCl đối chứng, IL-6 cơ bản tạo ra nằm trong khoảng từ $1,485 \text{ pg/mL} \pm 37$ đến $7,454 \text{ pg/mL} \pm 199$.

- với hỗn hợp 1, khả năng ức chế IL-6 tạo ra so với đối chứng NaCl, nằm trong khoảng từ $84 \text{ pg/mL} \pm 15$ đến $5,910 \text{ pg/mL} \pm 29$.

Kết luận:

- tạo ra và tạo ra quá mức không đồng nhất (lần lượt là 6h và 24h) đối với IL-6 sau khi tiếp xúc với NaCl và Hỗn hợp 1 (Fig. 6).

- ức chế không đồng nhất quá trình tạo ra IL-6 sau khi tiếp xúc với hỗn hợp 1 (5 mg/L hoạt chất) trung bình là 28% ở 6h và 19% ở 24h, so với đối chứng NaCl (Fig. 6).

Bằng cách ức chế quá trình tạo ra này, hỗn hợp 1 có tính dụng kháng viêm (Fig. 7).

Ví dụ 8 – Thoái biến huyết tương và thời gian bán thải

Một trong số các người cho các gốc (chủ yếu là $\text{HO}_2^{\cdot}$, có thời hạn lên tới vài giây và chỉ số thẩm tế bào đáng kể) bởi phản ứng loại Fenton-Haber-Weiss của hoạt chất MoO_4^{2-} của hỗn hợp 1 là H_2O_2 . Quá trình thoái biến chất vết này được tiến hành để đánh giá tốc độ tiêu thụ của hỗn hợp 1 hoặc quá trình thoái biến của nó.

Kỹ thuật:

Hỗn hợp 1 ($68,9 \mu\text{M}$ hoặc nồng độ cuối là $14,2 \mu\text{g/L}$) được ủ trong huyết tương mới của người. Động học H_2O_2 không xuất hiện được tiến hành bởi phản ứng peroxidaza trên các phần mẫu theo thời gian liên tiếp.

Kết quả:

- Trung bình ($n = 10$), tỷ lệ phần trăm thoái biến của chất vết của hỗn hợp 1 trong huyết tương của người ở nhiệt độ trong phòng sau thời gian tiếp xúc là 2 phút là $85,3 \pm 9,4\%$, $74\% \pm 15,2\%$ trong phút thứ nhất.

- Ở phút thứ nhất, "*Thời gian thoái biến 50%*" hoặc $\text{DT}_{50} = 0,812$ phút đối với dung dịch chứa hỗn hợp 1 với nồng độ hoạt chất ban đầu là $68,9 \mu\text{M}$ và nồng độ H_2O_2 là 1mM .

- Tốc độ thoái biến $\text{K}_{\text{CH}_2\text{O}_2} \approx 740 \mu\text{mol}$ của hỗn hợp 1 với nồng độ ban đầu là 1mM $\text{H}_2\text{O}_2/\text{phút./L}$ của huyết tương hoặc $\text{K}_{\text{cMoO}_4^{2-}} \approx 51,0 \mu\text{mol}$ của hỗn hợp 1 với nồng độ ban đầu là $68,9 \mu\text{M}$ hoạt chất $\text{MoO}_4^{2-}/\text{phút./L}$ của huyết tương, ở phút ủ thứ nhất ở nhiệt độ trong phòng.

- Đối với mẫu $200\mu\text{L}$ hỗn hợp 1 với nồng độ $24,3 \mu\text{M}$ ($5,0 \text{ mg/L}$) hoạt chất hoặc 353 mM (12 g/L) chất vết H_2O_2 , đối với điều trị khu trú, $\approx 5 \text{ nmol}$ hoạt chất MoO_4^{2-} hoặc $70 \mu\text{mol}$ chất vết H_2O_2 . Mẫu này, trong 1L huyết tương, bị thoái biến trong $\approx 0,1$ phút.

Ví dụ 9 – Độc tính với hệ tạo máu giới hạn ở máu ngoại vi.

Mục đích của nghiên cứu này là nhằm đánh giá độc tính với hệ tạo máu của hỗn hợp 1 ($24,3 \mu\text{M}$ hoặc nồng độ cuối là $5,0 \text{ mg/L}$) sau khi ủ 2, 3 và 5 phút ở máu ngoại vi của người. Độc tính đối với quá trình tiêu huyết được đánh giá theo thông số máu chính, tức là đếm hồng cầu, bạch cầu, hematocrit, tiểu cầu, thể tích globulin trung bình và nồng độ hemoglobin.

Kết luận:

Các thông số máu liên quan tới việc đếm hồng cầu, bạch cầu, hematocrit, thể tích globulin trung bình và nồng độ hemoglobin không được cải biến bằng cách ủ tối đa 5 phút với hỗn hợp theo sáng chế.

Việc đếm tiểu cầu được cải biến bằng cách tiếp xúc với hỗn hợp 1 từ -35% ngay sau nó được bổ sung, ở -69% ở 5 phút.

Ví dụ 10 – Quá trình đi qua da giới hạn của hỗn hợp theo sáng chế, mức độ hấp thu, pha sinh học và độ sinh khả dụng (OECD 428; EMEA, Hướng dẫn của người, 2001).

Hỗn hợp 1 được sử dụng đã được cô năm lần (Hỗn hợp 1 x5) sao cho các chất đi qua với lượng ít nhất. Mục đích của nghiên cứu này là nhằm đánh giá (tham khảo từ t0, t2 phút, đến t60 phút) khả năng đi qua của hỗn hợp 1 x5 cũng như của vết H_2O_2 thông qua việc sinh thiết da người không mắc bệnh.

Quy trình này được áp dụng đối với ba loại cơ chất: sinh thiết toàn phần, sinh thiết được phẫu tích trên biểu bì và trên hạ bì.

Kỹ thuật:

12 mẫu sinh thiết từ 2 người cho được thử nghiệm (các phép đo được tiến hành theo giọt được kết tụ trên vạt ghép [30 μ L]) và trong môi trường dưới đây [800 μ L]) theo cả hai phương pháp (Bảng 4): i) quercetin đánh giá hiệu quả oxy hóa khử của hỗn hợp 1 x5 và, ii) peroxidaza đánh giá vết nồng độ H_2O_2 .

Giọt (30 μ L) được lắng phủ trên các mẫu sinh thiết và vạt ghép biểu bì và trên da được cô đặc 5 lần trong hoạt chất (121,5 μ M hoặc 25,02 mg/L) và trong vết (1,77 M hoặc 60 g/L) so với chế phẩm điều trị (lần lượt là 24,3 μ M hoặc 5,0 mg/L và 352,8 mM hoặc 12 g/L). Trong 30 μ L hỗn hợp 1 x5 kết tụ, có 3,65 nmol hoặc 750 ng hoạt chất và 53 μ mol hoặc 1,8 mg vết.

Kết quả:

Bảng 4

	Thử nghiệm	Thử nghiệm	Sinh thiết*	Biểu bì*	Hạ bì*
Giọt	1	Hiệu quả thể oxy hóa khử	-1,4 đến -10,5	-5,7 đến -23,9	NT
	2	vết H ₂ O ₂	-16,5 đến -57,7	-72,5 đến -99,9	-99,6
Môi trường	3	Hiệu quả thể oxy hóa khử	+3,7 đến +9,0	+0,8 đến +80,6	+44,5 đến +100
	4	Vết H ₂ O ₂	< +0,001** đến +0,09	+0,38 to +1,7	+0,16 đến +0,46

* tính theo % so với t0 (-: giảm, +: tăng)

** giới hạn phát hiện.

Mức giảm từ nhẹ đến làm dịu (thử nghiệm 1) đối với hiệu quả oxy hóa khử của hỗn hợp 1 được quan sát giọt trên vết ghép (từ -1,4 đến -23,9%).

Mức giảm từ làm dịu đến đáng kể (thử nghiệm 2) đối với lượng vết H₂O₂ của hỗn hợp 1 được quan sát theo giọt trên vết ghép (từ -16,5 đến -99,9%).

Mức tăng từ nhẹ đến đáng kể (thử nghiệm 3) đối với hiệu quả của việc oxy hóa khử của môi trường dưới vật ghép được quan sát. Nó phụ thuộc vào vật ghép và loại của nó. Khi mẫu này là sinh thiết hoàn toàn, mức tăng này xuất hiện là do khả năng thấm qua da thấp. Trung bình là 6,35% và tương ứng với khả năng của hoạt chất của hỗn hợp 1 qua da là 232 pmol (47,6 ng). Khi nó là biểu bì hoặc hạ bì, mức tăng này sẽ thay đổi đáng kể (nằm trong khoảng từ 0,8 đến 100%). Điều này là thích hợp nhất do sự sai khác về cấu trúc mô học (lỗ, dẫn máu qua da, các điểm tận cùng của dây thần kinh trên biểu bì chẳng hạn).

Mức tăng từ không phát hiện được đến nhẹ (thử nghiệm 4) về lượng vết H₂O₂ trong môi trường dưới vật ghép được quan sát không liên quan tới loại của nó (từ <

+0,001 đến 1,7%). Khi nó là sinh thiết hoàn toàn, mức tăng này xuất hiện do khả năng đi qua da đặc biệt thấp ($< 0,53$ đến $47,7$ nmol, tức là $< 0,018$ đến $1,62$ μg). Khi nó là biểu bì hoặc hạ bì, thì mức tăng trung bình là thấp (lần lượt là 1,04 và 0,31%, tức là 0,55 μmol và 0,16 μmol , hoặc 18,7 μg và 5,6 μg).

Kết luận:

Sự độc lập với mô (mức độ hấp thu, khử hóa, khả năng thâm) của hai thông số liên quan khi hỗn hợp 1 có hiệu quả thể oxy hóa khử do hoạt chất và liều lượng của vết peroxit, người cho gốc.

Liên quan tới sự sinh thiết toàn phần, chỉ số thẩm thấu của hỗn hợp 1 tương ứng với độ dày của vật ghép, tức là nằm trong khoảng từ 1 mm (độ dày trung bình của biểu bì) đến 2 mm.

Biểu bì chứa nhiều đầu tận cùng của dây thần kinh có thể là trung tâm của quá trình khử muối sợi trục của các virion gây bệnh ecpet ở bệnh nhân. Chúng là các đích của hỗn hợp 1 theo cùng cách như các tế bào biểu bì nhiễm bệnh hoặc trước khi nhiễm bệnh. Bằng cách liên quan tới sự liên tục của cả hai mô, pha sinh học của hỗn hợp 1 hầu như là nghiêm ngặt về độ dày của biểu bì (1 mm) và có khả năng hấp thu ở mô đích tối đa.

Liên quan tới hạ bì được tạo mạch máu riêng rẽ, hiệu quả oxy hóa khử của hỗn hợp 1 thu được tối đa 80,6% có thể vẫn được tìm thấy khi tiếp xúc và 1,7% vết. Trong các điều kiện thử nghiệm này, sinh khả dụng của hỗn hợp 1 x5 là 2,94 nmol hoặc 605 ng hoạt chất và 0,9 μmol hoặc 30,6 μg vết peroxit.

Trong nghiên cứu độc tính gen *in vitro*, cùng với thử nghiệm Ames, hỗn hợp theo sáng chế và khả năng chuyển hóa của nó là không gây đột biến gen với sự có mặt của chất hoạt hóa S9 (5/5 chủng của *Salmonella*), gây đột biến gen trên 1/5 chủng khi nó không có mặt.

Khi dùng tại chỗ trên da được kích thích hoặc không, hỗn hợp theo sáng chế (24,3 μM hoặc 5,0 mg/L hoạt chất) không có độc tính kích thích liên quan bất kỳ.

Trong nghiên cứu kích thích trong miệng hoặc âm đạo, hỗn hợp theo sáng chế (24,3 μ M hoặc 5,0 mg/L) lần lượt là không gây kích ứng (số điểm 0/16) và kích ứng rất yếu (số điểm 1/16).

Trong nghiên cứu nhạy cảm mạnh với sự kích thích của màng đệm túi niêu của trứng gà mái, hỗn hợp 1 (18,23 và 24,3 μ M hoặc 3,75 và 5,0 mg/L) gây kích ứng nhẹ (Chỉ số kích ứng hoặc IS lần lượt = $6,8 \pm 0,4$ và $6,3 \pm 0/21$).

Trong nghiên cứu độc tính cấp tính khi dùng qua da, hỗn hợp theo sáng chế với liều lần lượt là 25,0 và 31,3 μ g/kg hoạt chất được chứa trong 60 và 75 mg/kg vết H_2O_2 , gây kích ứng mạnh nhưng không xuất hiện triệu chứng bất kỳ, đối với "Liều dung nạp tối đa" (MTD) và "Liều tối đa mà không có tác động bất lợi quan sát được bất kỳ" (MDWNODE) hoặc "Liều không gây tác dụng phụ quan sát được" (NOAEL) của 31,3 μ g/kg hoạt chất và 75 mg/kg vết.

Trong nghiên cứu độc tính cấp tính khi tiêm tĩnh mạch, hỗn hợp theo sáng chế với liều 10,4 và 12,5 μ g/kg hoạt chất lần lượt được chứa trong 25 và 30 mg/kg vết H_2O_2 , được dung nạp mà không gây ra các triệu chứng đáng chú ý bất kỳ đối với "Liều dung nạp tối đa" (MTD) của 12,5 μ g/kg hoạt chất.

Ví dụ 11 – Độc tính có thể chấp nhận được của hỗn hợp theo sáng chế

I – Tạo đột biến gen *in vitro* (Thử nghiệm Ames – OECD 471)

Mục đích của nghiên cứu này là nhằm đánh giá hoạt tính đột biến gen của hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế (Hỗn hợp 1) và khả năng chuyển hóa của nó (được sản xuất bởi phân đoạn S9 của gan chuột nhắt) đối với các chủng *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA102 và TA1535.

Kết luận:

- Khi không có hệ thống hoạt hóa S9 bất kỳ, hỗn hợp có hoạt tính (7,7 μ M hoặc 2,43 μ M, tức là 1,58 mg/L hoặc 0,50 mg/L) theo sáng chế và khả năng chuyển hóa của nó không gây đột biến gen bất kỳ trên các dòng TA97a, TA98, TA100 và TA1535.

- Khi có hệ hoạt hóa S9, hỗn hợp có hoạt tính (Hỗn hợp 1 x5: 121,5 μ M hoặc 25,02 mg/L) theo sáng chế và khả năng chuyển hóa của nó không gây đột biến gen trên các dòng TA97a, TA98, TA100, TA102 và TA1535.

- Khi không có hệ hoạt hóa S9, hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế không gây đột biến gen trên chủng TA102 ở 0,50 mg/L.

Trong thử nghiệm *in vitro* này, tác dụng đột biến gen của hỗn hợp có hoạt tính và của khả năng chuyển hóa của nó theo sáng chế được hạn chế dùng (chủng TA102).

II – Gây nhạy cảm da sau khi cảm ứng (Chuột đồng cái; OECD 406, ISO 10993-10: 2013 và sổ ghi nhớ ICH SCCP 2005)

Theo quy trình của Magnusson & Kligman (*Magnusson B. et al (1969) "The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test", J. Invest. Dermatol., 52(3), 268-276*), khả năng nhạy cảm của da chuột đồng cái được nghiên cứu theo ba trình tự.

Quy trình 1: Xác định liều giới hạn dung nạp

Các nồng độ của hỗn hợp 1 nằm trong khoảng từ 1,25 mg/L đến 20,00 mg/L hoạt chất lần lượt được chứa trong 3g/L đến 48 g/L vết H_2O_2 , trong 1mL « miếng dán » được dùng trong 24h bên sườn của con vật, và sau đó các con vật này được quan sát.

Nồng độ của hỗn hợp 1 ở 10 mg/L hoạt chất được chứa trong 24 g/L vết gây kích ứng mạnh và làm kích ứng nhẹ.

Nồng độ của hỗn hợp 1 ở 5,0 mg/L hoạt chất được chứa trong 12 g/L vết H_2O_2 gây kích ứng mạnh và được xem là liều không gây kích ứng tối đa.

Quy trình 2: Xác định liều giới hạn dung nạp sau khi tiêm dưới da.

Các nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mg/L đến 10 mg/L hoạt chất lần lượt được chứa trong 12 g/L đến 24 g/L vết H_2O_2 , của hỗn hợp 1 được tiêm (100 μ L) qua đường

dưới da. Ở 8 ngày (lần kích thích thứ nhất), lần dùng khu trú đầu tiên là 1mL "miếng dán". Ở 27 ngày (lần kích thích thứ hai), lần dùng khu trú thứ hai là 1mL « miếng dán ». Tiến hành quan sát ở 29 ngày.

Nồng độ của hỗn hợp 1 ở 5 mg/L hoạt chất, được chứa trong 12 g/L vết, dung nạp mạnh và không gây kích ứng.

Quy trình 3: Nghiên cứu sự rát da gây ra bởi sự kích thích và dùng khu trú hỗn hợp 1 ở 5 mg/L hoạt chất được chứa trong 12 g/L vết H₂O₂.

100 µl hỗn hợp 1 ở 5,0 mg/L được tiêm qua đường dưới da. Ở 4 ngày, khu vực tiêm được kích thích bằng dung dịch chứa natri dodecyl sulfat (SDS) ở 10% trước khi dùng khu trú hỗn hợp 1 (1ml) trong "miếng dán". Ở 6 ngày, dùng khu trú thứ hai. Ở 21 ngày (kích thích) dùng khu trú hỗn hợp 1 (1mL) trong « miếng dán » với các nồng độ nằm trong khoảng từ 6,26 đến 10 mg/L hoạt chất được chứa trong 15 đến 24 g/L vết.

Hỗn hợp 1 ở 5,0 mg/L hoạt chất được chứa trong 12 g/L vết gây kích ứng mạnh và số điểm nhảy dưới da bởi chế phẩm bằng 0/3.

Kết luận: Hỗn hợp 1 ở 5,0 mg/L hoạt chất không gây kích ứng. Không quan sát thấy có sự thay đổi vĩ mô ở da động vật. Do đó, không cần nghiên cứu giải phẫu bệnh lý.

III – Kích ứng xoang miệng và âm đạo (thỏ cái; OECD(99)20, -21, -23 -24, -(95)115, -(02) 9 và ISO-10993-10: 2013)

Mục đích của nghiên cứu này là nhằm đánh giá khả năng dung nạp của âm đạo và xoang miệng của hỗn hợp 1 ở 5,0 mg/L hoạt chất được chứa trong 12 g/L vết khi dùng tiếp xúc với chất điều trị trong 5 ngày.

Từ ngày 0 đến ngày 6, cứ 24h, các con vật được điều trị (1mL) qua xoang miệng và âm đạo. Ở ngày 7, các con vật được quan sát và trọng lượng của chúng được cân.

Kết luận: Nồng độ của hỗn hợp 1 ở 5,0 mg/L hoạt chất gây kích ứng mạnh. Chỉ số kích ứng xoang miệng và âm đạo lần lượt là 0/16 và 1/16. Do đó, không cần nghiên cứu giải phẫu bệnh lý.

IV – Thử nghiệm kích ứng mắt (ICCVAM App B)

Thử nghiệm kích ứng mắt được sử dụng là thử nghiệm thay thế HET-CAM (Thử nghiệm trứng gà mái – Màng đệm túi niếu), được công bố trên báo chính thống (the Official Journal) ngày 26/12/1996. Nó được khuyến dùng bởi ICCVAM.

Mặc dù phương pháp nhạy cảm đặc biệt này không được đánh giá chính thức bởi Châu Âu, nhưng nó được chấp nhận để sử dụng ở địa phương đối với các chất thậm chí gây kích ứng nhẹ bao gồm các chất có thể là gây kích ứng mắt để đăng ký chúng dưới tên R41 (2002).

Tóm lại, phương pháp này bao gồm việc dùng chất thử nghiệm nền của hỗn hợp 1 lần lượt ở 3,75 và 5,00 mg/L hoạt chất ở 9 và 12 g/L vết, trên màng đệm túi niếu của trứng gà mái. Ở 0,5, 2 và 5 phút sau khi tiếp xúc, ba tiêu chuẩn sau được quan sát và được ghi điểm: xuất huyết, kết tụ và sung huyết.

Kết quả và kết luận:

Hỗn hợp 1 ở 3,75 mg/L hoặc 5,00 mg/L hoạt chất có thể được phân loại ở dạng kích ứng dịu (Chỉ số kích ứng hoặc IS lần lượt = $6,8 \pm 0,4$ và $6,3 \pm 0,21$), tức là làm phân giải nhẹ (số điểm trầm trọng = 1/3) ngay sau đưa vào hoặc ở 30 giây sau khi tiếp xúc, không thấy xuất huyết hoặc kết tụ.

Liên quan tới trị số Q (tỷ lệ giữa các chỉ số giữa chất dương tính của NaOH tham khảo 0,1M [IS = 15 ± 3] và 1% SDS [10 ± 2] so với Hỗn hợp 1), Q so với NaOH = 0,51 đến 0,54 và Q so với SDS = 1,10 đến 1,18 đối với hỗn hợp 1 lần lượt ở 3,75 và 5,00 mg/L hoạt chất.

Do đó, liên quan tới thử nghiệm về tính cực nhạy này, là đáng kể hơn nhiều so với thử nghiệm kích ứng mạnh âm đạo ở thỏ cái, hỗn hợp 1 được xem là chất gây kích ứng nhẹ (3,75 mg/L) đến làm dịu (5,00 mg/L).

V – Nghiên cứu độc tính cấp tính khi dùng qua da và tiêm tĩnh mạch – Liều dung nạp tối đa (MTD) và Liều không gây độc tính quan sát được (NOAEL) (chuột cắt; OECD 474, ICH M3(R2) và S6(R1))

Mục đích của nghiên cứu này là nhằm xác định liều dung nạp tối đa (MTD) của hỗn hợp 1 khi dùng qua da (1mL) hoặc tiêm trong đuôi (5mL/kg). Các quan sát lâm sàng được báo cáo cho tới ngày 14.

Kết luận về quá trình dùng qua da:

Hỗn hợp 1 có liều 50 µg/kg hoạt chất (1mL đến 10 mg/L) gây kích ứng mạnh. Quan sát thấy ban đỏ nhẹ xuất hiện ở vùng điều trị cũng như không xuất hiện vảy cứng nhỏ trong vòng 2 ngày. Không quan sát thấy sự kích ứng.

Các triệu chứng nhẹ hơn tương tự được quan sát khi dùng hỗn hợp 1 với nồng độ 37,5 µg/kg hoạt chất (1mL đến 7,5 mg/L).

Hỗn hợp 1 với liều 25,0 và 31,3 µg/kg hoạt chất (1mL ở 5,0 và 6,26 mg/L) gây kích ứng mạnh. Không có triệu chứng trên da, trao đổi chất hoặc sinh lý ở D14.

MTD của hỗn hợp 1 khi dùng trên da ở chuột nhắt là 31,3 µg/kg hoạt chất (1mL đến 6,26 mg/L).

NOAEL (liều không gây độc tính quan sát được) của hỗn hợp 1 khi dùng trên da ở chuột là 31,3 µg/kg hoạt chất (1mL ở 6,26 mg/L).

Kết luận về quy trình tiêm trong đuôi:

Khó khăn trong việc tiêm tĩnh mạch của hỗn hợp 1 không phụ thuộc vào độc tính bên trong của sáng chế mà còn phụ thuộc vào quá trình phân hủy khi tiếp xúc với máu mà đặc biệt tạo ra oxy phân tử có thể đáp ứng với quá trình chuyển hóa. Liều hạn

chế quy cách (3 con chuột nhắt) đã chứng minh được mức ngừng hô hấp ngược là 14,6 µg/kg hoạt chất (5mL/kg hỗn hợp 1 ở 2,92 mg/L). Không quan sát thấy độc tính cho tới ngày D14.

Hỗn hợp 1 được dung nạp sau khi tiêm tĩnh mạch với liều 12,5 µg/kg hoạt chất (5mL/kg hỗn hợp 1 với liều 2,5 mg/L). Sự khó khăn về sinh lý (khó khăn trong vận động và hô hấp) được quan sát ở các con vật ở thời điểm tiêm. Không quan sát thấy độc tính cho tới ngày D14.

Các triệu chứng tương tự không đáng kể được quan sát sau khi tiêm tĩnh mạch với liều 10,4 µg/kg hoạt chất (5mL/kg hỗn hợp 1 với liều 2,1 mg/L). Không có dấu hiệu lâm sàng hoặc cải biến về đường cong trọng lượng. Không quan sát thấy độc tính cho tới ngày D14. Không quan sát vi mô các cơ quan ở D14 sau khi khám nghiệm.

MTD của hỗn hợp 1 khi tiêm trong đuôi với liều 12,5 µg/kg hoạt chất (5mL/kg hỗn hợp 1 với liều 2,5 mg/L).

VI – Nghiên cứu độc tính gne *in vivo* bằng cách nghiên cứu quá trình tạo nhân nhỏ sau khi tiêm tĩnh mạch hỗn hợp 1 (Chuột nhắt đực và cái; OECD 474 và ICH S2(R1))

Chuột nhắt cái (n=5) và chuột nhắt đực (n=5) được tiêm (hai lần điều trị ngắt quãng 22-26 giờ; 5mL/kg) bằng nước mang HPLC (đường tĩnh mạch), đối chứng dương tính xyclophosphamit với liều 5 và 10 mg/kg, đường tĩnh mạch và etyl metansulfonat với liều 100 và 150 mg/kg (đường trong màng bụng) và hỗn hợp 1 với liều 1,46, 4,17 và 12,5 µg/kg hoạt chất (đường tĩnh mạch).

Tỷ lệ bệnh tật, tỷ lệ tử vong, trọng lượng của các con vật và thông số lâm sàng (nhiệt độ, da, tóc, mắt, màng niêm dịch, bài tiết và tiết, chức năng hô hấp và thần kinh, dáng đi và tư thế) được ghi lại. 36h đến 48h sau lần điều trị thứ hai, máu của các con vật được gom lại và được phân tích trong máy đo dòng tế bào (đối chứng độc tính: giảm tỷ lệ hồng cầu non (Dương tính với CD-71). Tỷ lệ hồng cầu non nhân nhỏ (hồng

cầu lưới) được đánh giá trên 4.000 lần quan sát/mẫu máu. Mỗi quần thể chuột (n=10) đối với mỗi chất nền được thử nghiệm thể hiện 40.000 lần quan sát (Bảng 5).

Bảng 5:

Chất nền	mg/kg	Giới tính	n	Hồng cầu lưới (%)	Hồng cầu lưới nhân nhò (%)
Trước khi điều trị	#	đực	5	4,39±0,92	0,15±0,09
		cái	5	2,60±0,57	0,17±0,07
Đối chứng âm tính Nước	#	đực	5	5,17±1,47	0,32±0,31
		cái	5	3,82±0,29	0,12±0,04
Đối chứng dương tính 1 Xyclophosphamit	5	đực	5	3,99±0,49	0,56±0,17
		cái	5	2,41±0,54	0,40±0,13
	10	đực	5	1,95±0,59	1,62±0,29
		cái	5	1,30±0,43	1,02±0,26**
Đối chứng dương tính 2 Metansulfonat	100	đực	5	1,41±0,32	0,68±0,35**
		cái	5	1,86±0,25	0,48±0,16**
	150	đực	5	1,33±0,34	0,81±0,48**
		cái	5	0,45±0,33	0,59±0,26**
Hỗn hợp 1	1,46 .10 ⁻³ #	đực	5	5,32±0,76	0,10±0,02
		cái	5	3,35±0,46	0,09±0,03
	4,17 .10 ⁻³ #	đực	5	4,82±0,41	0,11±0,03
		cái	5	3,35±0,83	0,09±0,02
	12,5 .10 ⁻³ #	đực	5 - 3*	4,79±0,16	0,22±0,12
		cái	5 - 1*	3,40±0,19	0,09±0,02

* các con vật chết trong quá trình điều trị thứ nhất bằng cách chuyển hóa do giải phóng oxy phân tử từ hỗn hợp 1 tiếp xúc với máu.

** khác nhau về mặt thống kê so với nhóm đối chứng.

trong hoạt chất MoO_4^{2-}

Kết luận: Khi so sánh với các nhóm đối chứng (dương tính và âm tính), hỗn hợp 1 không có độc tính di truyền bất kỳ bằng cách tạo ra hồng cầu lưới nhân nhỏ sau khi tiêm tĩnh mạch chuột ($n=10$, bao gồm 5 con đực và 5 con cái) với khoảng liều 1,46, 4,17 và 12,5 $\mu\text{g/kg}$ hoạt chất.

Ví dụ 12 – So với chế phẩm khác

Ví dụ này thể hiện sự ảnh hưởng của chế phẩm, cụ thể là thể oxy hóa khử đối với:

1 – vai trò của canxi trong phản ứng xúc tác Fenton/Haber-Weiss "tương tự" của chế phẩm được thử nghiệm.

2 – có sự khác biệt giữa ba chế phẩm 5,0 mg/L chứa hoạt chất.

S1: Hỗn hợp 1,

S2: chế phẩm theo US 6,660,289,

S3: chế phẩm theo WO/2010/004161.

Quy trình 1 (Bảng 6 và 7):

- 2 thông số được đo: i) độ pH, ii) thể oxy hóa khử.
- chất xúc tác CaCl_2 (1M, trong H_2O): bổ sung nồng độ cuối là 24mM
- động học: ban đầu (T0), 1, 2, 3 phút (T1, T2, T3) sau khi bổ sung CaCl_2 đồng thời khuấy.

Kết quả và thảo luận:

Bảng 6

Dung dịch S1	T0	CaCl ₂ 24mM	T1	T2	T3	Trung bình (giữa T1 và T3)	Δ/T0
Độ pH	4,70	↓ ở T0	4,58	4,59	4,59	4,59 trong 3 phút	-0,11
Thế oxy hóa khử E°	359		383	383	383	383 trong 3 phút	+24
Dung dịch S2	T0	CaCl ₂ 24mM	T1	T2	T3	Trung bình (giữa T1 và T3)	Δ/T0
Độ pH	2,85	↓ ở T0	2,65	2,65	2,66	2,65 trong 3 phút	-0,20
Thế oxy hóa khử E°	437		479	475	474	476 trong 3 phút	+39
Dung dịch S3	T0	CaCl ₂ 24mM	T1	T2	T3	Trung bình (giữa T1 và T3)	Δ/T0
Độ pH	3,01	↓ at T0	2,86	2,87	2,87	2,87 trong 3 phút	-0,14
Thế oxy hóa khử E° (mV)	414		465	464	464	464 trong 3 phút	+50

Độ pH của da nằm trong khoảng từ 4,93+/-0,45 đến 5,12+/-0,56. Độ pH của âm đạo thường khoảng 4,50 và có thể dao động lên đến 6,00 ở thời kỳ mãn kinh.

- dung dịch S1 được tạo đệm và ở độ pH theo thứ tự của một trong số da và màng niêm dịch của người. Độ pH này được giữ hằng định tương đối lên đến 3 phút tiếp xúc sau khi bổ sung CaCl₂ với nồng độ cuối 24mM. Mức tăng nhẹ của E° được quan sát mà có thể bắt nguồn một phần từ việc bổ sung clo của CaCl₂.

- Độ pH axit làm khuếch đại quá trình peroxit hóa lipid gây độc tế bào gây ra bởi sắt.

Dung dịch S2 không được tạo đệm. Độ pH của nó rất không tương hợp để tiếp xúc với da hoặc niêm mạc (bao gồm sự phá hủy hệ vi khuẩn thông thường trong khi sử dụng điều trị). Độ pH này sẽ giữ tương đối hằng định lên tới 3 phút tiếp xúc sau khi bổ sung CaCl₂ với nồng độ cuối là 24mM. Mức tăng ít nhất là làm dịu hơn so với S1 với E° được quan sát có thể một phần là do bổ sung clo của CaCl₂.

Dung dịch S3 không được tạo đệm. Độ pH của nó rất không tương hợp để tiếp xúc với da hoặc màng niêm mạc (bao gồm sự phá huỷ hệ vi khuẩn thông thường trong khi sử dụng điều trị). Độ pH này giữ tương đối hằng định lên đến 3 phút tiếp xúc sau khi bổ sung CaCl_2 với nồng độ cuối là 24mM. Mức tăng đáng kể (+50mV) của E° được quan sát có thể một phần là do bổ sung clo CaCl_2 nhưng không liên quan tới sự khác nhau về mức tăng với S1 và S2, từ đó có thể không phải là yếu tố đơn lẻ.

Liên quan tới các ion Fe *tại chỗ*, ở độ pH axit (< 2,33), thế oxy hóa khử khoảng 400mV và Fe ở dạng (III), tức là ở dạng gây độc nhất. Ở độ pH khoảng 4,5, thế oxy hóa khử khoảng 300mV, thì hemoglobin Fe ở dạng (II) và Fe trong huyết tương được tạo phức chất với transferrin ở dạng (III).

Ở độ pH của các dung dịch S2 và S3, dạng sắt oxit $\text{Fe}(\text{OH})_3$ có nhiều nhược điểm. Do đó, các phản ứng Fenton-Haber-Weiss rất không hiệu quả.

Trị số của cặp $\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}$ (Loại Fenton) là: $E'^\circ = 1,19 - 0,18 \times \text{pH}$.

Bảng 7

	Chất hoạt động (mg/L)	Độ pH	$E^\circ_{\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}}$ (mV)*	E° dung dịch (mV)
S1	5,0	4,70	344	354
S2	5,0	2,80	686	428
S3	5,0	3,00	650	418

* nồng độ tế bào *tại chỗ* với sắt

Theo nghiên cứu này, đã khẳng định được rằng cặp $\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}$ có nhược điểm. Ngay cả khi nếu thế oxy hóa khử của cặp này được cải thiện (418-428mV), nó được duy trì đáng kể để tiếp xúc với tế bào.

- khả năng qua màng của tế bào động vật là âm tính ($\sim -70\text{mV}$). Khả năng oxy hóa-khử của dung dịch càng tăng, thì mức thay đổi về khả năng qua màng càng nhiều và tạo ra ứng suất oxy hóa tế bào càng tăng (gây chết theo chương trình, con đường eNOS, ...) cùng với việc tạo ra dòng canxi có khả năng tạo ra ứng suất tế bào đáng kể gây ra bởi dung dịch 2 và 3.

Do đó, độ pH và thế oxy hóa khử của chế phẩm S2 và đặc biệt là thế oxy hóa khử của chế phẩm S3 gây độc tế bào nhất. Cả hai dung dịch S2 và S3 này không thích hợp để sử dụng trong điều trị.

Quy trình 2 (Bảng 8):

Các nồng độ tế bào và huyết tương của canxi nằm trong khoảng từ 2 đến 3mM. Quy trình này trên cơ sở sử dụng chế phẩm trong điều trị.

- 1 thông số đo được: lượng peroxit dư (H_2O_2 , axit peraxetic; thử nghiệm khoảng Quantofix nằm trong khoảng từ 0 đến 25 mg/L).

- chất xúc tác $CaCl_2$ (1M, trong H_2O): bổ sung nồng độ cuối là 1,25, 2,5, 10, 25 và 50mM.

- thể tích cuối: 1ml = 0,950 μ L dung dịch được thử nghiệm + 0,05 μ L dịch hòa tan $CaCl_2$. Yếu tố hòa tan của dung dịch được thử nghiệm: 1,05. Nồng độ cuối của dung dịch được thử nghiệm 11,4 g/L (ban đầu là 12 g/L) của vết H_2O_2 chứa 4,76 mg/L hoạt chất (ban đầu 5,00 mg/L).

- động học: 5 phút sau khi bổ sung $CaCl_2$, đồng thời khuấy.

Kết quả:

Bảng 8

Thử nghiệm	Dung dịch được thử nghiệm	Cuối $[CaCl_2]$ (mM)	$[peroxits]_{cuối}$ (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 (WO/2010/004161)	2,5	>25
8	S3 (WO/2010/004161)	1,25	$\approx$ 25

Quá trình khử hóa chế phẩm S1 ở 5 phút tiếp xúc với $CaCl_2$ 2,5mM (nồng độ sinh lý) tương ứng với mức giảm peroxit bởi yếu tố 1.500 (Thử nghiệm 4), tức là nằm

trong khoảng từ 12g/L đến 8mg/L vết và nằm trong khoảng từ 5,00 mg/L đến 3,33 $\mu\text{g/L}$ hoạt chất).

Kết luận so sánh liên quan đến các chế phẩm S2 và S3

Dung dịch S2, không liên quan đến kim loại được sử dụng, là không tương hợp với việc điều trị, bởi:

- độ pH không tạo đệm của nó để duy trì khả năng của nó,
- thể oxy hóa khử gây độc tế bào của nó,
- độc lập tương đối với chất xúc tác canxi,
- độc tính tế bào của nó trong điều kiện sinh lý do H_2O_2 và axit peraxetic (ngoài sự có mặt của các ion Ag^+ , ví dụ, có độc tính tế bào không thuận nghịch),
- trong các điều kiện thử nghiệm được sử dụng, không có chất xúc tác tương tự Fenton-Haber-Weiss, do đó không tạo ra gốc hoạt động để sử dụng trong điều trị.

Dung dịch S3, không liên quan đến kim loại được sử dụng và cặp cation hóa được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent WO2010/004161, là không tương hợp với việc điều trị, bởi:

- độ pH của nó là không tương hợp với BAPTA,
- thể oxy hóa khử gây độc tế bào của nó,
- độc lập tương đối với chất xúc tác canxi,
- độc tính tế bào của nó trong điều kiện sinh lý do H_2O_2 và axit peraxetic,
- trong các điều kiện thử nghiệm được sử dụng, không có chất xúc tác tương tự Fenton-Haber-Weiss, do đó không tạo ra gốc hoạt động để sử dụng trong điều trị.

Trái lại, mô hình hóa phản ứng của chế phẩm S1 theo sáng chế là chính xác do khả năng không ổn định bởi canxi.

Đối với chế phẩm S1, lựa chọn:

- độ pH,
- cặp tạo đệm (bổ sung yếu tố đơn lẻ của cặp: axit axetic, do axit peraxetic được tạo ra với lượng nhỏ *tại chỗ*),
- kim loại chuyển tiếp và hóa trị của nó tương hợp với phản ứng tương tự Fenton-Haber-Weiss hoặc không,
- cặp chất càng hóa (độ tương hợp giữa chúng với $K_{d_{Ca^{2+}}}$ và $K_{d_{Mo}}$, $K_{d_{Fe^{2+}/Fe^{3+}}}$ theo dạng "bậc"),
- không chất càng hóa thẩm tế bào,
- hoạt hóa phức chất của dung dịch S1 bởi canxi hoặc các ion kim loại có mặt khác *tại chỗ*, ở liều sinh lý và độ pH (mức độ quan trọng của việc lựa chọn chất càng hóa), ở thể oxy hóa khử hạn chế quá trình oxy hóa lipid đặc biệt (tạo ra lượng rất nhỏ Fe(III)) và việc tạo ra tức thời các gốc hoạt động thẩm thấu ở khoảng ngắn, mà không gây tích tụ, sẽ làm cho chế phẩm này tương hợp với việc sử dụng trong điều trị.

Dung dịch S1 bị thoái biến rất mạnh với nồng độ canxi sinh lý với nồng độ tối thiểu là 2,5mM. Mức giảm (1,25mM) hoặc tăng (nằm trong khoảng từ 10 đến 50mM) của nồng độ canxi không phải sinh lý này sẽ làm thay đổi mạnh quá trình thoái biến của peroxit do các phản ứng tương tự Fenton-Haber-Weiss bằng cách thay đổi trạng thái cân bằng (định luật tác dụng khối lượng). Phức chất hóa học tương ứng với dung dịch S1 được làm thích ứng toàn bộ với phản ứng đặc hiệu trong hằng số tế bào và canxi huyết tương.

Ví dụ 13 - Ví dụ về hỗn hợp có hoạt tính theo sáng chế khi kết hợp Mo và La

Ví dụ về chế phẩm này ("Hỗn hợp 2") theo sáng chế này được tạo ra với muối molybden và muối lantan. Chế phẩm có công thức theo bảng 9 được điều chế, được biểu thị bằng nồng độ ban đầu của các hợp phần:

Bảng 9

Các chất	Hỗn hợp theo sáng chế
Natri molybdat	20,7 μ M
Lantan Nitrat	11,5 μ M
BAPTA	42 μ M
EGTA	1051,6 μ M
H ₂ O ₂	353mM
CH ₃ COOH/CH ₃ COONa	70mM
pH (by NaOH)	4,4 – 5,0
E ^o thế oxy hóa khử	300 đến 420mV

Chế phẩm được gọi là "ban đầu" do nó tương ứng với các nồng độ của các chất phản ứng đã được bổ sung mà không liên quan đến quy trình xúc tác được sử dụng.

Toàn bộ các chất được sử dụng trong quá trình tổng hợp và thành phẩm được kiểm định bởi phổ IR-FT.

Bảng 10

<u>Sản phẩm</u>	<u>Độ tinh khiết</u>	<u>Công thức phân tử</u>	<u>N° CAS</u>
<u>Natri molybdat dihydrat</u>	<u>98-103%</u>	<u>Na₂MoO₄.2H₂O</u>	<u>10102-40-6</u>
<u>lantan Nitrat hexahydrat</u>	<u>≥99%</u>	<u>La(NO₃)₃.6H₂O</u>	<u>10277-43-7</u>
<u>BAPTA : (axit 1,2-bis(o-aminophenoxy)etan-N,N,N',N'-tetraaxetic)</u>	<u>≥98%</u>	<u>C₂₂H₂₄N₂O₁₀</u>	<u>85233-19-8</u>
<u>EGTA: (axit etylen glycol-bis(2-aminoetylete)-N,N,N',N'-tetraaxetic)</u>	<u>≥99%</u>	<u>C₁₄H₂₄N₂O₁₀</u>	<u>67-42-5</u>
<u>Hydro Peroxit</u>	<u>29-31%</u>	<u>H₂O₂</u>	<u>722-84-1</u>
<u>Axit axetic băng*</u>	<u>99,8-100,5%</u>	<u>CH₃COOH</u>	<u>64-19-7</u>
<u>Natri Axetat trihydrat</u>	<u>99-101%</u>	<u>C₂H₃NaO₂.3H₂O</u>	<u>5010524</u>
<u>Natri hydroxyt</u>	<u>10N</u>	<u>NaOH</u>	<u>1310-73-2</u>
<u>Nước mềm</u>	<u>1μS</u>	<u>H₂O</u>	<u>7732-18-5</u>

Hoạt chất là: (MoO₄)¹⁻, Na⁺ (lantan hydroperoxomolybdat).

Phân tử lượng: 481,81 g/mol.

Quy trình sản xuất:

Quy trình sản xuất là tương tự với hỗn hợp 1 trong Ví dụ 1, ngoại trừ các biến đổi được mô tả dưới đây:

- hai dung dịch SC cần được điều chế:

Dung dịch A - Na₂MoO₄.2H₂O (nguồn Mo(VI); 100%) 200mg (nồng độ cuối là 2,4mM)

Nước

vừa đủ 340ml

Khuấy nhẹ, nhiệt độ trong phòng

Dung dịch B - $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (nguồn $\text{La}(\text{III})$; 100%) 200mg (nồng độ cuối là 1,4mM)

Nước

vừa đủ 340ml

Khuấy nhẹ, nhiệt độ trong phòng

- Dung dịch A (10mL) và sau đó dung dịch B (10mL) được đưa từ từ vào dung dịch Si2 để điều chế dung dịch S1 của lantan hydroperoxomolybdat

- Bước (vii): Bổ sung chất càng hóa - điều chế dung dịch S4

Đưa BAPTA (98,8%)

20mg/L,

Đưa EGTA (99,1%)

400mg/L

- độ pH của dung dịch cuối được điều chỉnh bởi NaOH tới 4,67

- E_{redox} cuối là: 380 mV

Trong hỗn hợp 2, nồng độ cuối của $\text{La}(\text{MoO}_4)^{1-}$, Na^+ là: 20,8 μM .

Ví dụ 14 - Đánh giá hiệu quả oxy hóa khử của sáng chế trong phức chất kép Molybdat và lanthanat trên huyết tương của người

Để so sánh hiệu quả oxy hóa của chế phẩm $(\text{MoO}_4)^{2-}$ (Hỗn hợp 1) và $\text{La}(\text{MoO}_4)^{1-}$ (Hỗn hợp 2), chế phẩm có nồng độ so sánh với nồng độ được mô tả trong Fig. 3 và thấp hơn nồng độ được mô tả trong Fig. 5 được tiếp xúc với huyết tương của người trong 2 phút sau khi loại mẫu trắng thử nghiệm, đặc biệt ở vùng nồng độ, các hỗn hợp 1 và 2 theo sáng chế làm tăng lượng quercetin đã được oxy hóa tạo ra tại chỗ. Nồng độ cuối của MoO_4^{2-} và $\text{La}(\text{MoO}_4)^{1-}$ được thử nghiệm sau đó lần lượt là: 0,00, 3,80, 7,59, 1215 nM và 0,00, 3,25, 6,50, 1,040 nM (Fig. 8).

Sự khác nhau về lượng tạo ra quercetin đã được oxy hóa (đỉnh xung quanh 295 nm) giữa hai chế phẩm (Hỗn hợp 1 và Hỗn hợp 2) là không đáng kể. Hiệu quả oxy hóa khử giữa hai chế phẩm theo sáng chế là tương đương nhau.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm hoặc hỗn hợp dùng khu trú, tốt hơn là có hoạt tính điều trị khi dùng khu trú, chứa:

- ít nhất một muối kim loại, kim loại này được chọn từ molybden (Mo), vonfram (W), vanadi (V), vàng (Au), lantanit;
- ít nhất một chất càng hóa;
- ít nhất một nguồn chứa gốc peroxit hóa;
- ít nhất một tác nhân tạo đệm.

trong đó, chế phẩm hoặc hỗn hợp này có thế oxy hóa khử nằm trong khoảng từ 250 đến 550 milivolt.

2. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, chế phẩm hoặc hỗn hợp này có thế oxy hóa khử nằm trong khoảng từ 300 đến 450 milivolt.
3. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, trong đó kim loại nói trên là ở dạng peroxometalat hoặc hydro-peroxometalat và kim loại này có hóa trị tối đa.
4. Chế phẩm hoặc hỗn hợp theo điểm 3, trong đó peroxometalat hoặc hydro-peroxometalat nêu trên còn chứa $(\text{Mo}_2\text{O}_6)^{4+}$ hoặc $[\text{Mo}_4\text{O}_{12}(\text{O}_2)_2]^{4+}$.

5. Chế phẩm hoặc hỗn hợp theo điểm 3, trong đó chế phẩm hoặc hỗn hợp này chứa tác nhân càn hóa được chọn từ trong số BAPTA, EGTA và hỗn hợp bất kỳ của chúng, và tác nhân đệm hóa này cho phép độ pH từ 4,0 đến 5,2.
6. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, trong đó kim loại được oxy hóa đến mức độ oxy hóa tối đa của nó.
7. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, trong đó muối kim loại là muối của molybden hoặc chứa molybden.
8. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, trong đó muối kim loại là muối của lantanit hoặc chứa lantanit.
9. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, trong đó muối kim loại là hỗn hợp chứa muối molybden và muối lantanit.
10. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, trong đó, muối molybden là đơn vị peroxo hoặc hydroperoxo.
11. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, trong đó, muối kim loại nêu trên là có kiểu MoO_4^{2-} hoặc dạng hydro-peroxo của nó.

12. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, trong đó nó chứa ít nhất hai tác nhân càn hóa.
13. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, trong đó, tác nhân càn hóa có ít nhất ba nhóm phối trí, ở ba đầu của (các) phân tử tạo ra (các) chất càn hóa, các nhóm phối trí này cần được tách bởi chuỗi gồm ít nhất ba nguyên tử bao gồm ít nhất một nguyên tử nitơ.
14. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, trong đó chất càn hóa được chọn từ nhóm bao gồm BAPTA, EGTA và hỗn hợp bất kỳ của chúng.
15. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, trong đó, nguồn chủ yếu chứa gốc peroxit hóa có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 200 đến 600 mM.
16. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, trong đó, hỗn hợp này chứa tác nhân tạo đệm mà cho phép độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,2.
17. Chế phẩm dùng khu trú hoặc hỗn hợp dùng khu trú theo điểm 1, trong đó, hỗn hợp này có thể oxy hóa khử nằm trong khoảng từ 350 đến 420 milivolt.

18. Dược phẩm để dùng khu trú, trong đó dược phẩm này chứa hỗn hợp hoặc chế phẩm có hoạt tính trị liệu, như được xác định theo điểm 1.
19. Dược phẩm để dùng khu trú theo điểm 18, trong đó dược phẩm này chứa hỗn hợp hoặc chế phẩm có hoạt tính trị liệu với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 5mM.
20. Dược phẩm để dùng khu trú theo điểm 18, trong đó dược phẩm này chứa peroxo- hoặc hydro-peroxomolybdat chứa $(\text{Mo}_2\text{O}_6)^{4+}$ hoặc $[\text{Mo}_4\text{O}_{12}(\text{O}_2)_2]^{4+}$.
21. Dược phẩm để dùng khu trú theo điểm 18, trong đó muối kim loại và tác nhân càng hóa có mặt với lượng và tỷ lệ đủ để tạo ra phức {peroxo-metalat-tác nhân càng hóa}.
22. Dược phẩm để dùng khu trú theo điểm 18, trong đó dược phẩm này chứa muối của molybden hoặc chứa molybden, trong đó chế phẩm hoặc hỗn hợp này chứa tác nhân càng hóa được chọn từ trong số BAPTA, EGTA và hỗn hợp bất kỳ của chúng, và trong đó chế phẩm này chứa tác nhân đệm hóa cho phép độ pH từ 4,0 đến 5,2.
23. Chế phẩm hoặc hỗn hợp theo điểm 1, trong đó lantanoit nêu trên là lantan.

24. Chế phẩm hoặc hỗn hợp theo điểm 1, trong đó muối kim loại và tác nhân càng hóa có mặt với lượng và tỷ lệ đủ để tạo ra phức {peroxo-metalat-tác nhân càng hóa}.
25. Dược phẩm để dùng khu trú chứa ít nhất một muối kim loại, kim loại này được chọn từ molybden (Mo), vonfram (W), vanadi (V), vàng (Au), lantanoid; ít nhất một chất càng hóa; và nguồn chứa gốc peroxit hóa; dược phẩm này có thể oxy hóa khử nằm trong khoảng từ 250 đến 550 milivolt.
26. Phương pháp điều chế hỗn hợp dùng khu trú hoặc chế phẩm dùng khu trú theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước (i) điều chế dung dịch đệm (BS) chứa tác nhân tạo đệm có độ pH axit, (ii) điều chế dung dịch chứa phức chất kim loại (SC) chứa muối kim loại oxit, (iii) điều chế dung dịch ban đầu thứ nhất (Si1) chứa hydro peroxit, (iv) điều chế dung dịch ban đầu thứ hai (Si2) bằng cách trộn dung dịch BS với dung dịch Si1, (v) điều chế dung dịch (S1) chứa hợp chất peroxo-kim loại bằng cách trộn dung dịch SC với dung dịch Si2, (vi) điều chế dung dịch S2 bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch S1 bằng bazơ, độ pH của dung dịch S2 có tính bazơ hơn so với độ pH của dung dịch BS, (vii) bổ sung một hoặc một vài chất càng hóa vào dung dịch S2, (viii) tùy ý điều chỉnh độ pH, (ix) tùy ý điều chỉnh thể tích của dung dịch cuối, thu được hỗn hợp hoặc chế phẩm như được xác định theo điểm 1.
27. Phương pháp theo điểm 26, trong đó hydro peroxit có mặt trong dung dịch Si1 với nồng độ nằm trong khoảng từ 200 đến 600 mM.
28. Phương pháp theo điểm 26, trong đó tác nhân tạo đệm của dung dịch BS là dung dịch đệm axit carboxylic/carboxylat, và dung dịch BS có tỷ lệ hydro peroxit/carboxylat nằm trong khoảng từ 20/1 đến 1/1.

29. Phương pháp theo điểm 26, trong đó phương pháp này có bước đo thế oxy hóa khử ở bước (iii) đến (ix).
30. Phương pháp theo điểm 26, trong đó hợp chất peroxo-kim loại của dung dịch S1 là hợp chất peroxo-molybden.

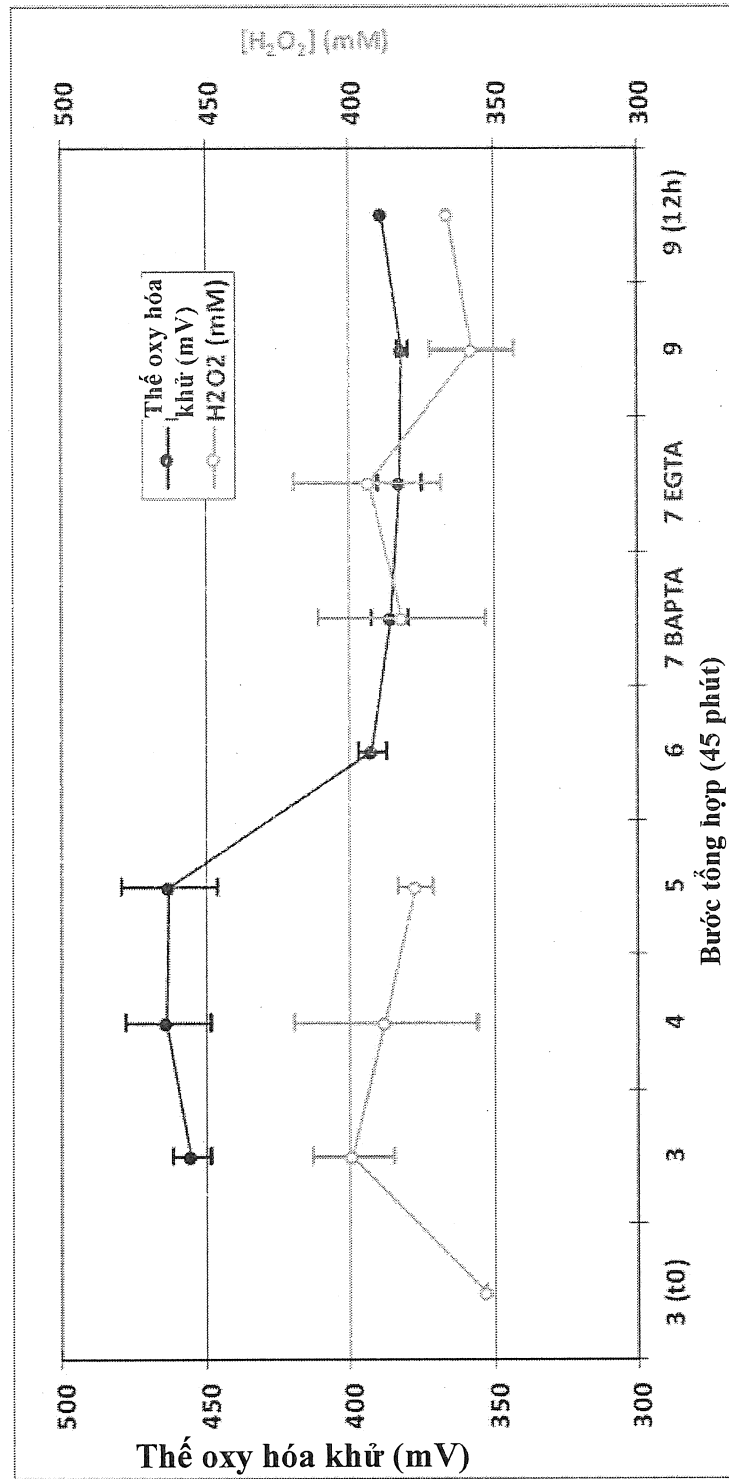


Fig. 1

2/7

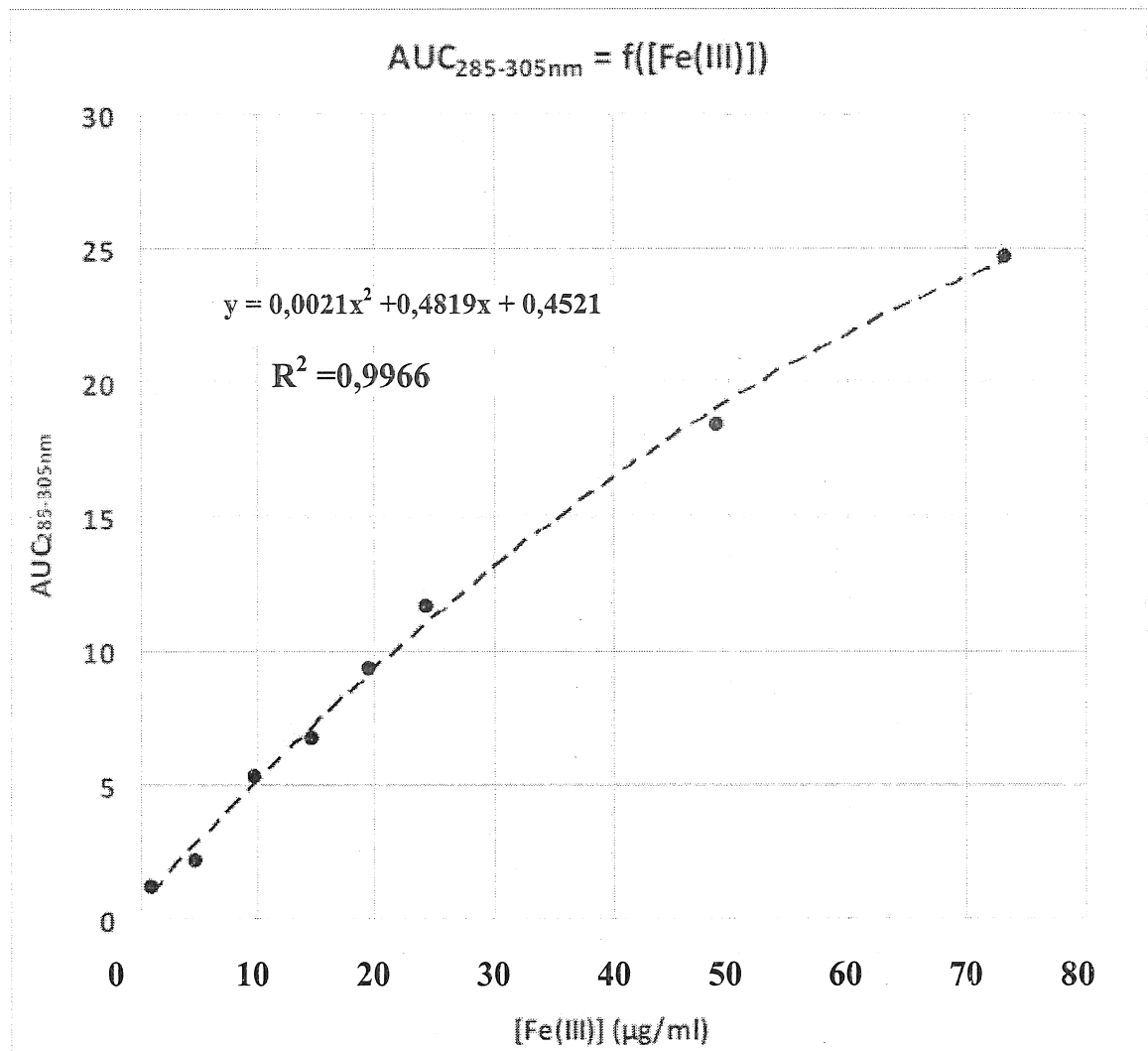


Fig. 2

3/7

Hỗn hợp 1

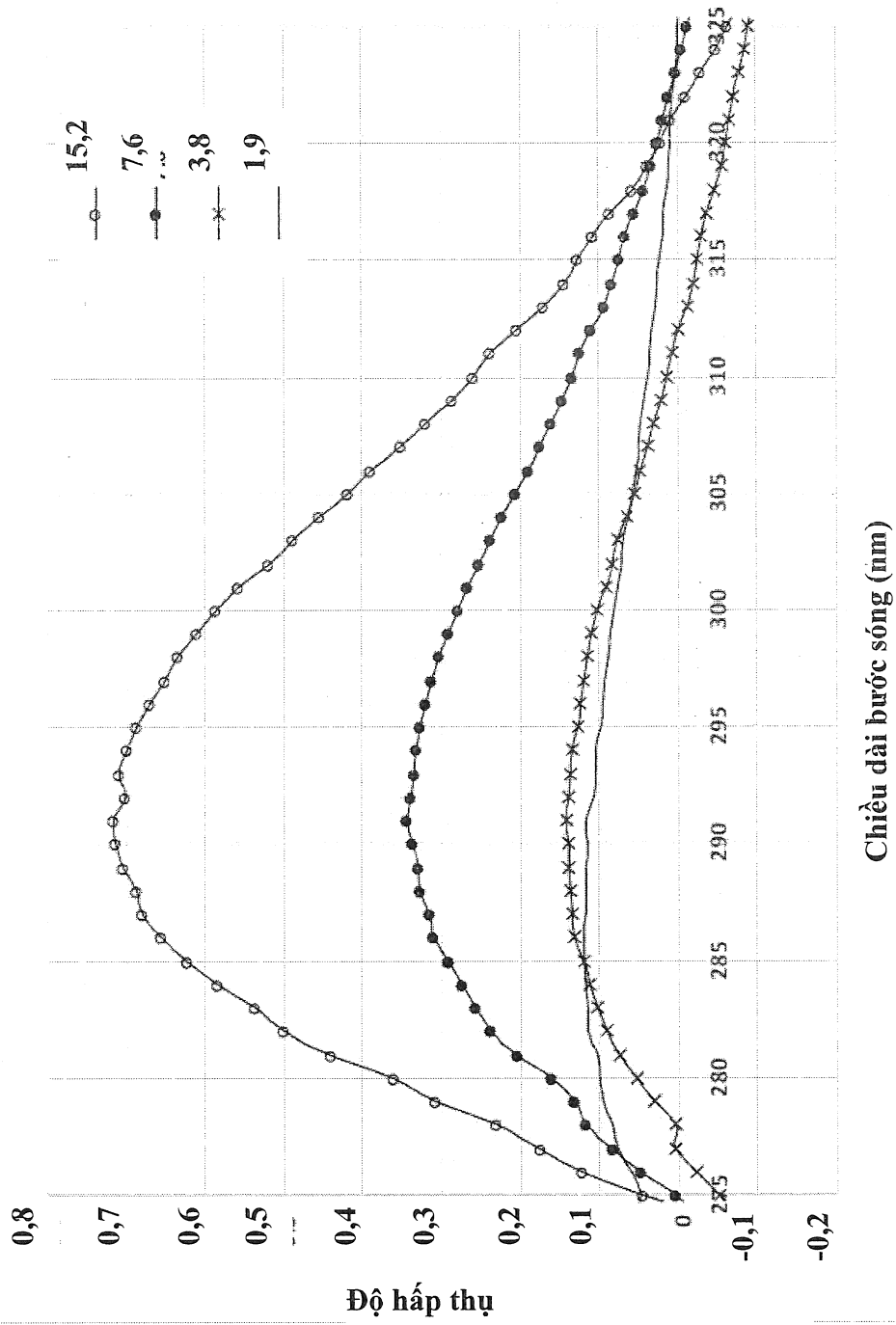


Fig. 3

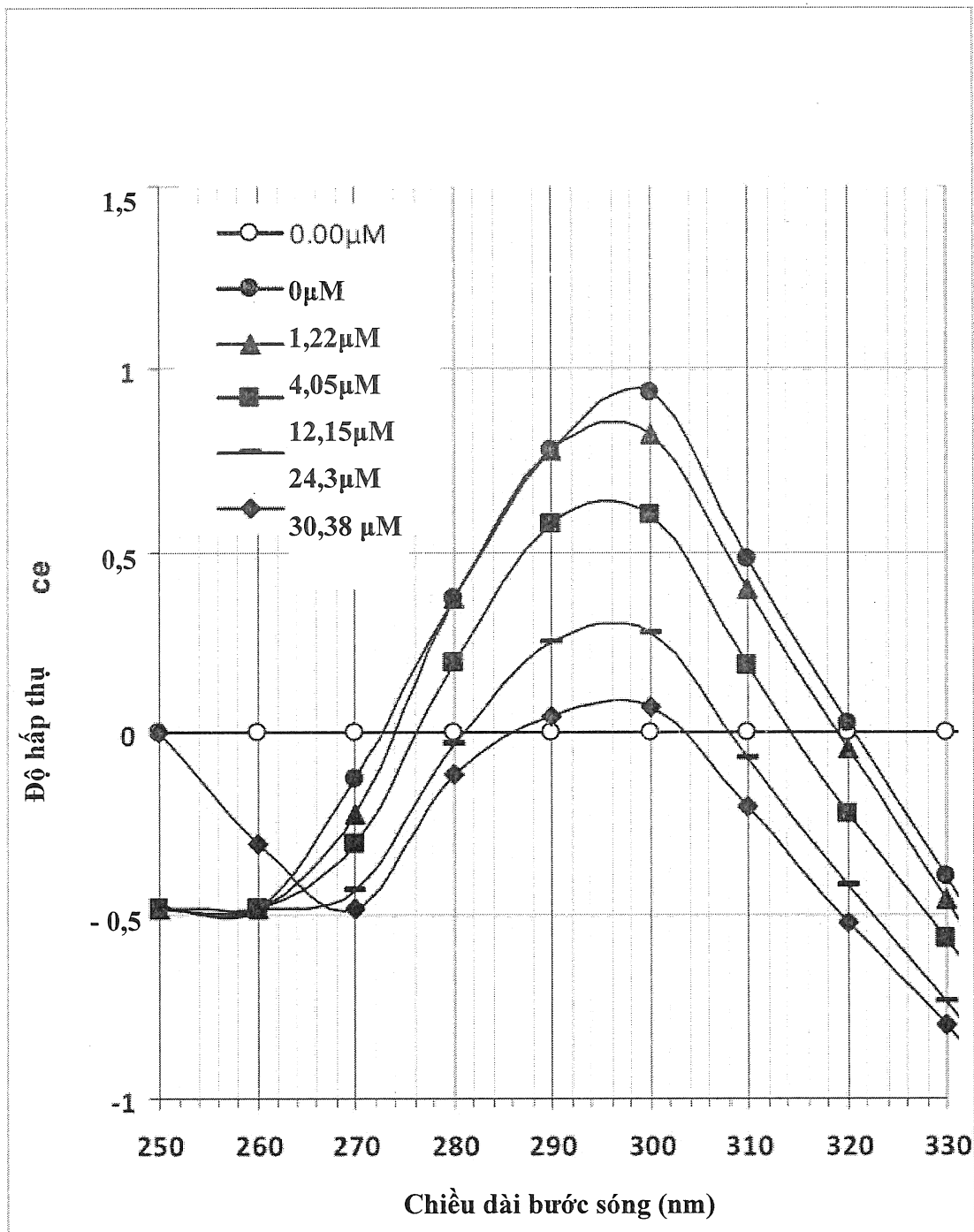


Fig. 5

6/7

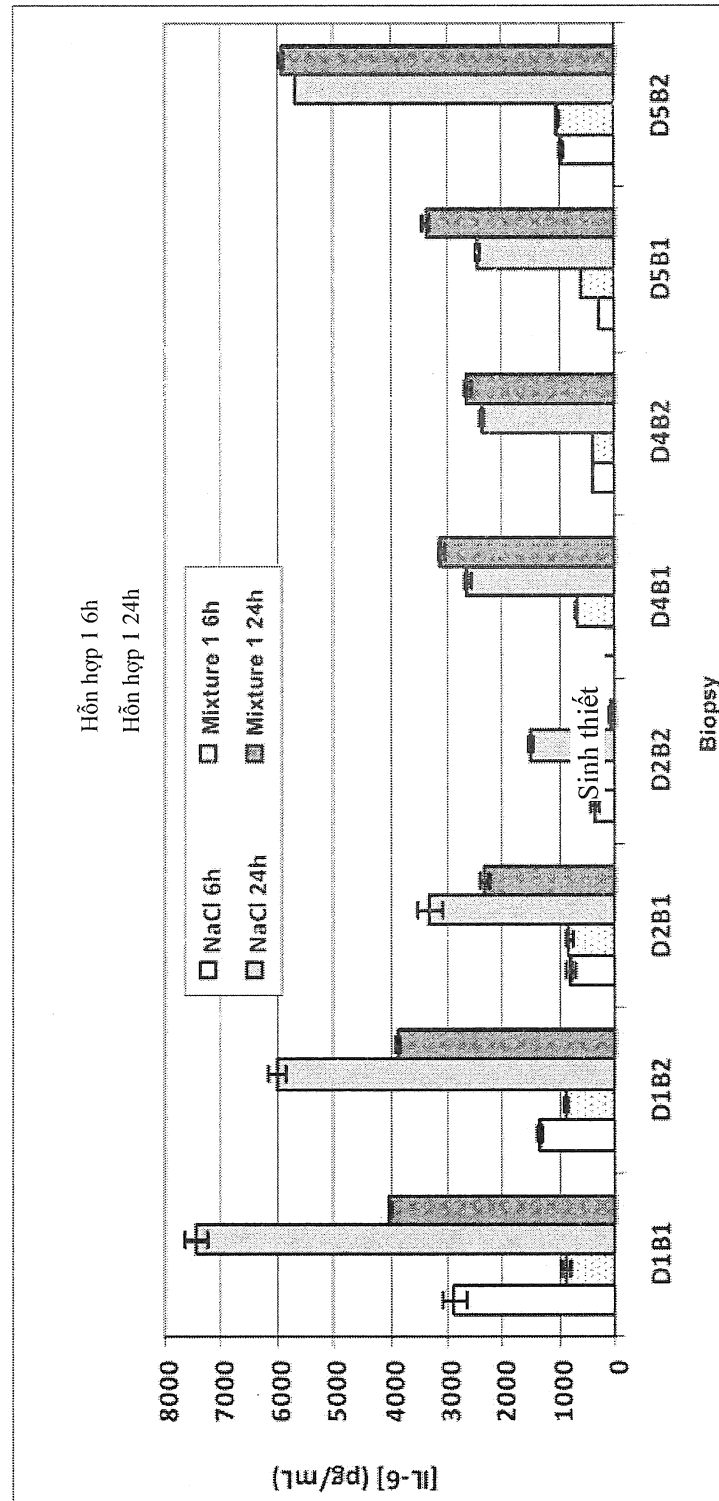


Fig. 6

7/7

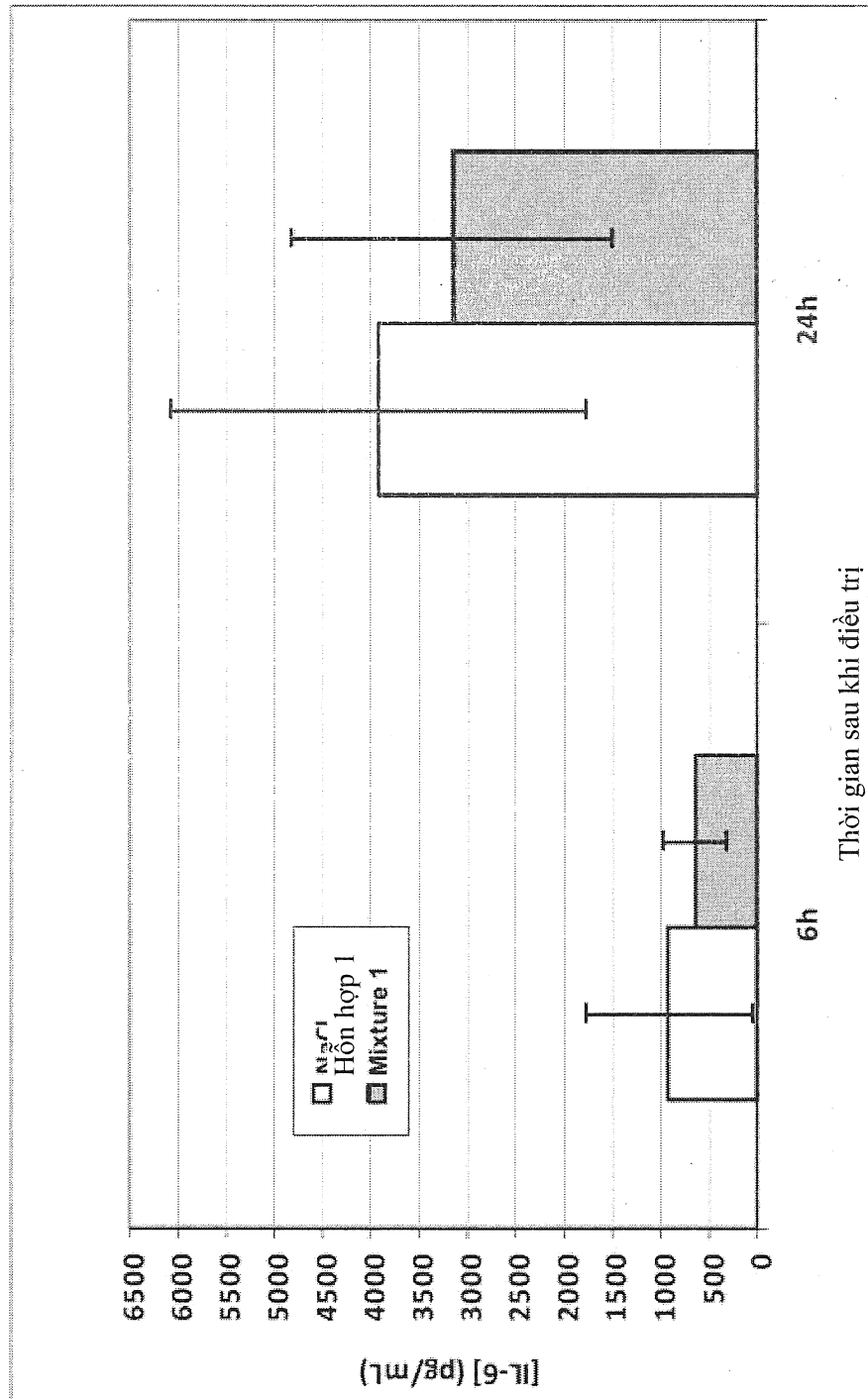


Fig. 7