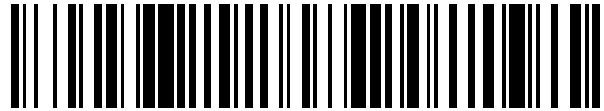


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 393**

21 Número de solicitud: 201390006

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

15.07.2011

30 Prioridad:

15.07.2010 RU 2010129290  
01.07.2011 RU 2011127059  
15.07.2010 RU 2010129292  
15.07.2010 RU 2010129294  
15.07.2010 RU 2010129295  
15.07.2010 RU 2010129298  
21.07.2010 RU 2010130348  
21.07.2010 RU 2010130353  
21.07.2010 RU 2010130355  
21.07.2010 RU 2010130356  
21.07.2010 RU 2010130358  
17.03.2011 RU 2011110106  
01.07.2011 RU 2011127051  
01.07.2011 RU 2011127052  
01.07.2011 RU 2011127053  
01.07.2011 RU 2011127055  
01.07.2011 RU 2011127058  
15.07.2010 RU 2010129291

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.01.2014

71 Solicitantes:

**EPSHTEIN, Oleg Iliich (100.0%)**  
**4 Samotyochny Per., d. 3, Kv. 72**  
**127473 Moscú RU**

72 Inventor/es:

**EPSHTEIN, Oleg Iliich**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

54 Título: **UN MÉTODO PARA AUMENTAR EL EFECTO DE UNA FORMA ACTIVADA POTENCIADA DE UN ANTICUERPO**

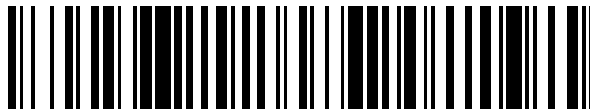
ES 2 440 393 A2

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 393**

21 Número de solicitud: 201390006

57 Resumen:

Un método para aumentar el efecto de una forma activada potenciada de un anticuerpo. La presente invención proporciona un método para aumentar el efecto de una forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena que se selecciona del grupo de la proteína S-100, el antígeno prostático específico, el receptor de la insulina y el receptor de la angiotensina II, mediante la combinación de una forma activada potenciada de un anticuerpo contra dicha molécula biológica endógena, con una forma activada potenciada de un anticuerpo contra la NO sintasa endotelial. La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende a) una forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena que se selecciona del grupo de la proteína S-100, el antígeno prostático específico, el receptor de la insulina y el receptor de la angiotensina II, y b) una forma activada potenciada de un anticuerpo contra la NO sintasa endotelial.

ES 2 440 393 A2

## DESCRIPCIÓN

Un método para aumentar el efecto de una forma activada potenciada de un anticuerpo

### Campo

- 5 La presente invención se refiere a un método para aumentar el efecto de una forma activada potenciada de un anticuerpo y una formulación farmacéutica que comprende una forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena, seleccionada del grupo de la proteína S-100, el antígeno prostático específico, el receptor de la insulina y el receptor de la angiotensina II, y una forma activada potenciada de un anticuerpo contra la NO sintasa endotelial.

### Antecedentes

- 10 El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa que se ha demostrado que actúa en la señalización de los diferentes procesos biológicos. El NO derivado del endotelio es una molécula clave en la regulación del tono vascular y su asociación con enfermedades vasculares ha sido ampliamente reconocida. El NO inhibe muchos de los procesos conocidos por estar involucrado en la formación de la placa aterosclerótica, incluyendo la adhesión de monocitos, agregación plaquetaria y la proliferación del músculo liso vascular de la célula. Otro papel importante del NO endotelial es
- 15 la protección de la pared vascular por el estrés oxidativo inducido por sus productos metabólicos propios y por los productos de oxidación de lípidos y lipoproteínas. La disfunción endotelial se produce en etapas muy tempranas de la aterosclerosis. Por tanto, es posible que la deficiencia de la disponibilidad local de NO pudiera ser una vía final común que acelera la aterogénesis en los seres humanos. Además de su papel en el endotelio vascular, se ha demostrado que la disponibilidad de NO modula el metabolismo de las lipoproteínas. Se ha reportado correlación negativa entre las
- 20 concentraciones plasmáticas de productos metabólicos del NO y los niveles de totales de colesterol y asociado a lipoproteínas de baja densidad en plasma, mientras que las lipoproteínas de alta densidad [HDL] mejoran la función vascular en pacientes con hipercolesterolemia. La pérdida de NO tiene un efecto considerable en el desarrollo de la enfermedad. La diabetes mellitus se asocia con mayores tasas de morbilidad y mortalidad causada principalmente por el desarrollo acelerado de la enfermedad aterosclerótica. Por otra parte, los informes muestran que los diabéticos tienen funciones del pulmón disminuidas. Se ha propuesto que la resistencia a la insulina conduce a la inflamación de las vías respiratorias. (Habib et al., *Nitric Oxide Measurement From Blood To Lungs, Is There A Link?* Pak J Physiol 2007; 3(1).)

El óxido nítrico es sintetizado por el endotelio a partir de la L-arginina por la sintasa de óxido nítrico (NO sintasa). La NO sintasa existe en diferentes isoformas, incluyendo una forma constitutiva (cNOS) y una forma inducible (iNOS). La forma constitutiva está presente en las células endoteliales normales, las neuronas y otros tejidos.

- 30 El efecto terapéutico de una forma extremadamente diluida (o forma ultrabaja) de los anticuerpos potenciados por la tecnología homeopática (forma activada potenciada) ha sido descubierto por el Dr. Oleg I. Epshtein. La patente de EE.UU. No. 7.700.096 describe una forma potenciada homeopáticamente de anticuerpos frente a la NO sintasa endotelial. La forma potenciada homeopáticamente de anticuerpos frente a NO sintasa endotelial se comercializa en la Federación de Rusia y otros países bajo el nombre Impaza®.
- 35 Hay una continua necesidad de un método para aumentar el efecto de una forma activada potenciada de un anticuerpo.

### Sumario

- 40 De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un método para aumentar el efecto de una forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena, comprendiendo dicho método la combinación de dicha molécula biológica endógena con una forma activada potenciada de un anticuerpo contra la NO sintasa endotelial. Idealmente, el aspecto del método de la invención incluye la administración de dicha combinación a un paciente en necesidad de tratamiento con dicha forma activada potenciada de un anticuerpo.

- 45 En una variante, dicha forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena es un anticuerpo contra la proteína S-100. En otra variante, dicha forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena es un anticuerpo contra el antígeno prostático específico. En otra variante, dicha forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena es un anticuerpo contra el receptor de la insulina. En otra variante, dicha forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena es un anticuerpo contra el receptor de angiotensina II.

- 50 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende a) una forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena, y b) una forma activada potenciada de un anticuerpo contra la NO sintasa endotelial. Preferiblemente, la composición farmacéutica farmacéuticamente aceptable es un vehículo sólido. Preferiblemente, la forma activada potenciada de un anticuerpo contra la NO sintasa

endotelial contiene una mezcla de diluciones homeopáticas C12, C30 y C200 impregnadas en el soporte sólido. La forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena puede ser un anticuerpo monoclonal, policlonal o natural. Preferiblemente, el anticuerpo contra el receptor de la insulina humana es un anticuerpo policlonal.

5 Se contempla que la composición farmacéutica comprenda una forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena preparada por sucesivas diluciones centesimales, junto con agitación de cada dilución. También se contempla que el anticuerpo contra la NO sintasa endotelial sea monoclonal, policlonal o natural. Se prefiere que el anticuerpo contra la NO sintasa endotelial sea un anticuerpo policlonal. Se contempla que la forma activada potenciada de un anticuerpo contra la NO sintasa endotelial se prepara por sucesivas diluciones centesimales, junto con agitación de cada dilución.

## 10 Descripción de las figuras

Figura 1 – Ilustra el efecto de las preparaciones ensayadas sobre el nivel de glucosa en plasma sanguíneo de ratas con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina

15 Figura 2 – Ilustra el efecto de las preparaciones ensayadas en el día 14 después de la inyección sobre los indicadores del área situada bajo la curva de concentración – tiempo (AUC) en el ensayo de tolerancia a la glucosa en ratas con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina.

Figura 3 – Ilustra el efecto de las preparaciones ensayadas sobre el nivel de glucosa en plasma sanguíneo de ratas con diabetes mellitus espontánea y no dependiente de insulina.

20 Figura 4 – Ilustra el efecto de las preparaciones ensayadas en el día 28 después de la inyección sobre los indicadores del área situada bajo la curva de concentración – tiempo (AUC) en el ensayo de tolerancia a la glucosa en ratas con diabetes mellitus espontánea y no dependiente de insulina.

## Descripción detallada

La invención se define con referencia a las reivindicaciones adjuntas. Con respecto a las afirmaciones, el glosario que sigue proporciona las definiciones pertinentes.

25 El término "anticuerpo" como se usa aquí, se entenderá como una inmunoglobulina que se une específicamente a, y por ello se define como complementaria a, una determinada organización espacial y polar de otra molécula. Los anticuerpos mencionados en las reivindicaciones podrá incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma, pueden ser naturales, policlonales o monoclonales, y pueden incluir varias clases e isotipos, como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F (ab')<sub>2</sub>, Fab', y similares. El singular "anticuerpo" incluye el plural "anticuerpos".

30 El término forma "activada potenciada" o "forma potenciada", respectivamente, con respecto a los anticuerpos mencionados aquí se utiliza para designar un producto de la potenciación homeopática de cualquier solución inicial de anticuerpos. "Potenciación homeopática" se refiere a la utilización de métodos de la homeopatía para impartir potencia homeopática a una solución inicial de la sustancia en cuestión. Aunque no es tan limitado, "la potenciación homeopática" puede implicar, por ejemplo, repetidas diluciones consecutivas en combinación con un tratamiento externo, en particular  
35 agitación vertical (mecánica). En otras palabras, una solución inicial de los anticuerpos se somete a la dilución consecutiva repetida y múltiples agitaciones verticales de cada solución obtenida con arreglo a técnicas homeopáticas. La concentración preferida de la solución inicial de anticuerpos en el disolvente, preferentemente agua o una mezcla de agua y alcohol etílico, oscila entre 0,5 y 5,0 mg / ml. El procedimiento preferido para la preparación de cada componente, es decir, una solución de anticuerpos, es el uso de la mezcla de tres diluciones acuosas o acuosas-alcohólicas de la solución de la matriz primaria (tintura madre) de anticuerpos diluidos 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup> y 100<sup>200</sup> veces, respectivamente, lo que equivale a diluciones centesimales homeopáticas (C12, C30 y C200) o el uso de la mezcla de tres diluciones acuosas o acuosas-alcohólicas de la solución de la matriz primaria de anticuerpos diluidos veces 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup> and 100<sup>50</sup>, respectivamente, lo que equivale a diluciones homeopáticas centesimales (C12, C30 y C50). Ejemplos de la potenciación homeopática se describen en las patentes de EE.UU. Nos. 7.572.441 y 7.582.294, que se incorporan por referencia a la presente memoria  
40 en su totalidad y para el propósito indicado. Mientras que el término forma "activada potenciada" se utiliza en las reivindicaciones, el término "dosis ultrabajas" se usa en los ejemplos. El término "dosis ultrabajas" se convirtió en un término técnico en el campo de la técnica creado por el estudio y uso de la forma diluida y potenciada homeopáticamente de la sustancia. El término "dosis ultrabaja" o "dosis ultrabajas" se entiende como soporte completo y básicamente sinónimo del término forma "activada potenciada" utilizado en las reivindicaciones.

50 En otras palabras, un anticuerpo está en la forma "activada potenciada" o "potenciada" cuando tres factores están presentes. En primer lugar, la forma "activada potenciada" del anticuerpo es un producto de un proceso de preparación bien aceptado en la técnica homeopática. En segundo lugar, la forma "activada potenciada" de anticuerpo debe tener una

actividad biológica determinada por métodos aceptados en la farmacología moderna. Y en tercer lugar, la actividad biológica exhibida por la forma "activada potenciada" del anticuerpo no se puede explicar por la presencia de la forma molecular de los anticuerpos en el producto final del proceso homeopático.

5 Por ejemplo, la forma activada potenciada de anticuerpos se pueden preparar sometiendo un anticuerpo inicial, aislado en forma molecular, a varias diluciones múltiples consecutivas, junto con un impacto externo, como la agitación mecánica. El tratamiento externo en el curso de la reducción de la concentración también se puede lograr, por ejemplo, por la exposición a factores ultrasónicos, electromagnéticos, u otros factores de tipo físico. V. Schwabe "Homeopathic medicines", M., 1967, y las patentes de EE.UU. Nos. 7.229.648 y 4.311.897, que se incorporan por referencia en su totalidad y para el propósito indicado, describen los procesos que son métodos de potenciación homeopática bien aceptados en el arte de la homeopatía. Este procedimiento da lugar a una disminución uniforme en la concentración molecular de la forma molecular inicial del anticuerpo. Este procedimiento se repite hasta que la potencia homeopática deseada se obtiene. Para el anticuerpo individual, la potencia homeopática requerida se puede ser determinada sometiendo las diluciones intermedias a pruebas biológicas en el modelo farmacológico deseado. Aunque no es tan limitado, "la potenciación homeopática" puede implicar, por ejemplo, repetidas diluciones consecutivas en combinación con un tratamiento externo, en particular agitación vertical (mecánica). En otras palabras, una solución inicial de los anticuerpos se somete a la dilución consecutiva repetida y a múltiples sacudidas verticales de cada solución obtenida de acuerdo a técnicas homeopáticas. La concentración preferida de la solución inicial de anticuerpos en el disolvente, preferiblemente, agua o una mezcla de agua y alcohol etílico, oscila entre 0,5 y 5,0 mg / ml. El procedimiento preferido para la preparación de cada componente, es decir, una solución de anticuerpos, es el uso de la mezcla de tres diluciones acuosas o acuosas-alcohólicas de la solución de la matriz primaria (tintura madre) de anticuerpos diluidos  $100^{12}$ ,  $100^{30}$  y  $100^{200}$  veces, respectivamente, lo que equivale a las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30 y C200 o la mezcla de tres diluciones acuosas o acuoso de alcohol de la solución de la matriz primaria (tintura madre) de anticuerpos diluidos  $100^{12}$ ,  $100^{30}$  y  $100^{50}$  veces, respectivamente, lo que equivale a diluciones homeopáticas centesimales C12, C30 y C50. Ejemplos de cómo obtener la potencia deseada también se proporcionan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nos. 7.229.648 y 4.311.897, que se incorporan por referencia para el propósito indicado. El procedimiento aplicable a la forma "activada potenciada" de los anticuerpos descritos en este documento se describe con más detalle a continuación.

Ha habido una cantidad considerable de controversia sobre el tratamiento homeopático en los seres humanos. Aunque la presente invención se basa en los procesos homeopáticos aceptados para obtener la forma "activada potenciada" de anticuerpos, no se basa únicamente en la homeopatía en los seres humanos para pruebas de la actividad. Sorprendentemente, se ha descubierto por el inventor de la presente solicitud y quedó ampliamente demostrado en los modelos farmacológicos aceptados que el disolvente obtenido en última instancia a partir de la dilución consecutiva múltiple de una forma molecular inicial de un anticuerpo tiene actividad definitiva relacionada con la presencia de las trazas de la forma molecular del anticuerpo en la dilución objetivo. La forma "activada potenciada" del anticuerpo proporcionado en este documento se analiza para determinar la actividad biológica en modelos farmacológicos aceptados de actividad, ya sea en experimentos apropiados "in vitro", o en modelos animales adecuados "in vivo". Los experimentos mencionados a continuación también proporcionan evidencias de actividad biológica en dichos modelos. Los estudios clínicos en humanos también demuestran que la actividad observada en el modelo animal es trasladable a la terapia humana. Los estudios en humanos también han proporcionado pruebas de la disponibilidad de las formas "activada potenciada" descrita en este documento para el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos bien aceptados como situaciones patológicas en la ciencia médica.

Además, la forma "activada potenciada" reivindicada de anticuerpos sólo abarca soluciones o preparados sólidos cuya actividad biológica de la que no se puede explicar por la presencia de la forma molecular de los anticuerpos que quedan de la solución inicial de partida. En otras palabras, aunque se contempla que la forma "activada potenciada" de los anticuerpos puede contener trazas de la forma molecular inicial de los anticuerpos, un experto en la materia no podría atribuir la actividad biológica observada en los modelos farmacológicos aceptados a la forma molecular remanente de los anticuerpos con algún grado de plausibilidad debido a las concentraciones extremadamente bajas de la forma molecular de los anticuerpos que quedan después de las diluciones consecutivas. Aunque la invención no está limitada por ninguna teoría específica, la actividad biológica de la forma "activada potenciada" de los anticuerpos de la presente invención no es atribuible a la forma molecular inicial de los anticuerpos. Se prefiere la forma "activada potenciada" de anticuerpos en forma líquida o sólida en la que la concentración de la forma molecular de los anticuerpos está por debajo del límite de detección de las técnicas analíticas aceptadas, tales como electroforesis capilar y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. Se prefiere particularmente la forma "activada potenciada" de anticuerpos en forma líquida o sólida en la que la concentración de la forma molecular de los anticuerpos está por debajo del número de Avogadro. En la farmacología de formas moleculares de las sustancias terapéuticas, es una práctica común crear una curva de dosis de respuesta en la que se representa el nivel de la respuesta farmacológica contra la concentración del principio activo administrado al sujeto o probado in vitro. El nivel mínimo del fármaco que produce una respuesta detectable se conoce como una dosis umbral. Se contempla específicamente y se prefiere que la forma "activada potenciada" de los anticuerpos contenga el anticuerpo molecular, de haber alguno, a una concentración por debajo de la dosis umbral de la forma molecular del anticuerpo en el modelo biológico dado.

La composición de combinación farmacéutica de acuerdo con este aspecto de la invención puede estar en forma líquida o en forma sólida. Cada una de las formas activadas potenciadas de los anticuerpos incluidos en la composición farmacéutica se prepara a partir de una forma molecular inicial de los anticuerpos a través de un proceso aceptado en el arte homeopático. Los anticuerpos de partida pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales preparados de acuerdo con los procedimientos conocidos, por ejemplo, como se describe en *Immunotechniques*, G. Frimel, M., "Meditsyna", 1987, p. 9-33; "Hum. Antibodies. Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after" de Laffly E., Sodoyer R. – 2005 – Vol. 14. – N 1-2. P.33-55, ambos incorporados aquí como referencia.

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener, por ejemplo, por medio de la tecnología del hibridoma. La etapa inicial del proceso incluye la inmunización basada en los principios ya desarrollados en el curso de la preparación de antisueros policlonales. Las etapas posteriores de trabajo implican la producción de células híbridas generando clones de anticuerpos con idéntica especificidad. Su aislamiento por separado se realiza utilizando los mismos métodos que en el caso de la preparación de antisueros policlonales.

Los anticuerpos policlonales se pueden obtener a través de la inmunización activa de animales. Para este propósito, por ejemplo, los animales adecuados (por ejemplo, conejos), reciben una serie de inyecciones del antígeno apropiado, por ejemplo, NO sintasa. El sistema inmune de los animales genera los correspondientes anticuerpos, que se obtienen de los animales de una manera conocida. Este procedimiento permite la preparación de un suero rico en anticuerpos mono-específicos.

Si se desea, el suero que contiene los anticuerpos puede ser purificado, por ejemplo mediante el uso de cromatografía afín, el fraccionamiento por precipitación de sales, o la cromatografía de intercambio iónico. El suero purificado resultante, enriquecido en anticuerpos, puede ser utilizado como material de partida para la preparación de la forma activada potenciada de los anticuerpos. La concentración preferida de la solución resultante inicial de anticuerpos en el disolvente, preferentemente agua o una mezcla de agua y alcohol etílico, oscila entre 0,5 y 5,0 mg / ml.

El procedimiento preferido para la preparación de cada componente de la combinación de fármacos de acuerdo con la presente invención es el uso de la mezcla de tres diluciones acuosas-alcohólicas de la solución de la matriz primaria de anticuerpos diluidos  $100^{12}$ ,  $100^{30}$  y  $100^{50}$  veces, respectivamente, lo que equivale a diluciones homeopáticas centesimales C12, C30 y C50, o diluidos  $100^{12}$ ,  $100^{30}$  y  $100^{200}$  veces, respectivamente, lo que equivale a diluciones homeopáticas centesimales C12, C30 y C200. Para preparar una forma farmacéutica sólida, un se trata un vehículo sólido con la dilución deseada obtenida a través del proceso homeopático. Para obtener una forma unitaria sólida de dosificación de la combinación de la invención, la masa del vehículo es impregnada con cada una de las diluciones. Ambos órdenes de impregnación son adecuados para preparar la forma combinada de dosificación deseada.

En una realización ideal, el material de partida para la preparación de la forma activada potenciada que comprende la combinación de la invención es un anticuerpo policlonal generado en un animal contra el antígeno correspondiente, es decir, la NO sintasa y una molécula biológica endógena. Para obtener la forma activada potenciada de anticuerpos policlonales contra la NO sintasa, el antígeno deseado se puede inyectar como inmunógeno en un animal de laboratorio, preferiblemente, conejos. Los anticuerpos policlonales contra la NO sintasa se pueden obtener utilizando toda la molécula de la NO sintasa bovina de la siguiente secuencia:

SEQ ID NO: 1

	Met	Gly	Asn	Leu	Lys	Ser	Val	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Pro	Pro	Cys
	1				5					10					15
40	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Cys	Gly	Lys	Gln	Gly
	16				20					25					30
	Pro	Ala	Ser	Pro	Ala	Pro	Glu	Pro	Ser	Arg	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala
	31				35					40					45
	Thr	Pro	His	Ala	Pro	Asp	His	Ser	Pro	Ala	Pro	Asn	Ser	Pro	Thr

ES 2 440 393 A2

46                      50                      55                      60  
 Leu Thr Arg Pro Pro Glu Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn  
 61                      65                      70                      75  
 Trp Glu Leu GLys er Ile Thr Tyr Asp Thr Leu Cys Ala Gln Ser  
 5      76                      80                      85                      90  
 Gln Gln Asp Gly Pro Cys Thr Pro Arg Cys Cys Leu Gly Ser Leu  
 91                      95                      100                      105  
 Val Leu Pro Arg Lys Leu Gln Thr Arg Pro Ser Pro Gly Pro Pro  
 106                      110                      115                      120  
 10      Pro Ala Glu Gln Leu Leu Ser Gln Ala Arg Asp Phe Ile Asn Gln  
 121                      125                      130                      135  
 Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Ser GLys er Gln Ala His Glu Glu  
 136                      140                      145                      150  
 Arg Leu Gln Glu Val Glu Ala Glu Val Ala Ser Thr Gly Thr Tyr  
 15      151                      155                      160                      165  
 His Leu Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala Lys Gln Ala Trp  
 166                      170                      175                      180  
 Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Gly Lys Leu  
 181                      185                      190                      195  
 20      Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Ser Ser Ala Gln Glu Met Phe  
 196                      200                      205                      210  
 Thr Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly Asn  
 211                      215                      220                      225  
 Leu Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Ala Pro Gly Arg

ES 2 440 393 A2

226                      230                      235                      240  
 Gly Asp Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly  
 241                      245                      250                      255  
 Tyr Arg Gln Gln Asp GLys er Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val  
 5    256                      260                      265                      270  
 Glu Ile Thr Glu Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn  
 271                      275                      280                      285  
 Gly Arg Phe Asp Val Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Glu  
 286                      290                      295                      300  
 10    Ala Pro Glu Leu Phe Val Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val  
 301                      305                      310                      315  
 Pro Leu Glu His Pro Thr Leu Glu Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu  
 316                      320                      325                      330  
 Arg Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile  
 15    331                      335                      340                      345  
 Gly Gly Leu Glu Phe Ser Ala Ala Pro Phe Ser Gly Trp Tyr Met  
 346                      350                      355                      360  
 Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys Asp Pro His Arg Tyr  
 361                      365                      370                      375  
 20    Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp Leu Asp Thr Arg  
 376                      380                      385                      390  
 Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val Glu Ile Asn  
 391                      395                      400                      405  
 Leu Ala Val Leu His Ser Phe Gln Leu Ala Lys Val Thr Ile Val



ES 2 440 393 A2

406                    410                    415                    420  
 Asp His His Ala Ala Thr Val Ser Phe Met Lys His Leu Asp Asn  
 421                    425                    430                    435  
 Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile  
 5    436                    440                    445                    450  
 Val Pro Pro Ile Ser GLys er Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu  
 451                    455                    460                    465  
 Met Val Asn Tyr Ile Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp  
 466                    470                    475                    480  
 10    Pro Trp Lys GLy Ser Ala Thr Lys Gly Ala Gly Ile Thr Arg Lys  
 481                    485                    490                    495  
 Lys Thr Phe Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser  
 496                    500                    505                    510  
 Leu Met Gly Thr Leu Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu  
 15    511                    515                    510                    525  
 Tyr Ala Ser Glu Thr Gly Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu  
 526                    530                    535                    540  
 Gly Arg Leu Phe Arg Lys Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met  
 541                    545                    550                    555  
 20    Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser Leu Glu His Glu Ala Leu Val Leu  
 556                    560                    565                    570  
 Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly  
 571                    575                    580                    585  
 Glu Ser Phe Ala Ala Ala Leu Met Glu Met Ser Gly Pro Tyr Asn

ES 2 440 393 A2

586                    590                    595                    600  
 Ser Ser Pro Arg Pro Glu Gln His Lys Ser Tyr Lys Ile Arg Phe  
 601                    605                    610                    615  
 Asn Ser Val Ser Cys Ser Asp Pro Leu Val Ser Ser Trp Arg Arg  
**5** 616                    620                    625                    630  
 Lys Arg Lys Glu Ser Ser Asn Thr Asp Ser Ala Gly Ala Leu Gly  
 631                    635                    640                    645  
 Thr Leu Arg Phe Cys Val Phe Gly Leu GLy Ser Arg Ala Tyr Pro  
 646                    650                    655                    660  
**10** His Phe Cys Ala Phe Ala Arg Ala Val Asp Thr Arg Leu Glu Glu  
 661                    665                    670                    675  
 Leu Gly Gly Glu Arg Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Asp Glu Leu  
 676                    680                    685                    690  
 Cys Gly Gln Glu Glu Ala Phe Arg Gly Trp Ala Lys Ala Ala Phe  
**15** 691                    695                    700                    705  
 Gln Ala Ser Cys Glu Thr Phe Cys Val Gly Glu Glu Ala Lys Ala  
 706                    710                    715                    720  
 Ala Ala Gln Asp Ile Phe Ser Pro Lys Arg Ser Trp Lys Arg Gln  
 721                    725                    730                    735  
**20** Arg Tyr Arg Leu Ser Thr Gln Ala Glu Gly Leu Gln Leu Leu Pro  
 736                    740                    745                    750  
 Gly Leu Ile His Val His Arg Arg Lys Met Phe Gln Ala Thr Val  
 751                    755                    760                    765  
 Leu Ser Val Glu Asn Leu Gln Ser Ser Lys Ser Thr Arg Ala Thr

ES 2 440 393 A2

766                      770                      775                      780  
 Ile Leu Val Arg Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Gly Leu Gln Tyr  
 781                      785                      790                      795  
 Gln Pro Gly Asp His Ile Gly Ile Cys Pro Pro Asn Arg Pro Gly  
 5    796                      800                      805                      810  
 Leu Val Glu Ala Leu Leu Ser Arg Val Glu Asp Pro Pro Pro Pro  
 811                      815                      820                      825  
 Thr Glu Ser Val Ala Val Glu Gln Leu Glu Lys GLys er Pro Gly  
 826                      830                      835                      840  
 10    Gly Pro Pro Pro Ser Trp Val Arg Asp Pro Arg Leu Pro Pro Cys  
 841                      845                      850                      855  
 Thr Leu Arg Gln Ala Leu Thr Phe Phe Leu Asp Ile Thr Ser Pro  
 856                      860                      865                      870  
 Pro Ser Pro Arg Leu Leu Arg Leu Leu Ser Thr Leu Ala Glu Glu  
 15    871                      875                      880                      885  
 Pro Ser Glu Gln Gln Glu Leu Glu Thr Leu Ser Gln Asp Pro Arg  
 886                      890                      895                      900  
 Arg Tyr Glu Glu Trp Lys Trp Phe Arg Cys Pro Thr Leu Leu Glu  
 901                      905                      910                      915  
 20    Val Leu Glu Gln Phe Pro Ser Val Ala Leu Pro Ala Pro Leu Leu  
 916                      920                      925                      930  
 Leu Thr Gln Leu Pro Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Val Ser  
 931                      935                      940                      945  
 Ser Ala Pro Asn Ala His Pro Gly Glu Val His Leu Thr Val Ala

ES 2 440 393 A2

946                      950                      955                      960  
 Val Leu Ala Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Leu Gly Pro Leu His Tyr  
 961                      965                      970                      975  
 Gly Val Cys Ser Thr Trp Leu Ser Gln Leu Lys Thr Gly Asp Pro  
 5 976                      980                      985                      990  
 Val Pro Cys Phe Ile Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro  
 991                      995                      1000                      1005  
 Asp Pro Tyr Val Pro Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile  
 1006                      1010                      1015                      1020  
 10 Ala Pro Phe Arg Gly Phe Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu  
 1021                      1025                      1030                      1035  
 Ser Lys Gly Leu Gln Pro Ala Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys  
 1036                      1040                      1045                      1050  
 Arg Cys Ser Gln Leu Asp His Leu Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asp  
 15 1051                      1055                      1060                      1065  
 Ala Gln Glu Arg Gly Val Phe Gly Arg Val Leu Thr Ala Phe Ser  
 1066                      1070                      1075                      1080  
 Arg Glu Pro Asp Ser Pro Lys Thr Tyr Val Gln Asp Ile Leu Arg  
 1081                      1085                      1090                      1095  
 20 Thr Glu Leu Ala Ala Glu Val His Arg Val Leu Cys Leu Glu Arg  
 1096                      1100                      1105                      1110  
 Gly His Met Phe Val Cys Gly Asp Val Thr Met Ala Thr Ser Val  
 1111                      1115                      1120                      1125  
 Leu Gln Thr Val Gln Arg Ile Leu Ala Thr Glu Gly Asp Met Glu

ES 2 440 393 A2

1126                      1130                      1135                      1140  
 Leu Asp Glu Ala Gly Asp Val Ile Gly Val Leu Arg Asp Gln Gln  
 1141                      1145                      1150                      1155  
 Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr Gln Glu  
 5    1156                      1160                      1165                      1170  
 Val Thr Ser Arg Ile Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu Arg  
 1171                      1175                      1180                      1185  
 His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro  
 1186                      1190                      1195                      1200  
 10    Asp Thr Pro Gly Pro  
 1201                      1205

Los anticuerpos policlonales contra la NO sintasa se pueden obtener utilizando toda la molécula de la NO sintasa humana de la siguiente secuencia:

SEQ ID NO: 2

15    Met Gly Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys  
 1                                      5                                      10                                      15  
 Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly  
 16                                      20                                      25                                      30  
 Pro Ala Thr Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Ser Leu  
 20    31                                      35                                      40                                      45  
 Leu Pro Pro Ala Pro Glu His Ser Pro Pro Ser Ser Pro Leu Thr  
 46                                      50                                      55                                      60  
 Gln Pro Pro Glu Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn Trp Glu  
 61                                      65                                      70                                      75

ES 2 440 393 A2

Val GLys er Ile Thr Tyr Asp Thr Leu Ser Ala Gln Ala Gln Gln  
 76 80 85 90  
 Asp Gly Pro Cys Thr Pro Arg Arg Cys Leu GLys er Leu Val Phe  
 91 95 100 105  
 5 Pro Arg Lys Leu Gln Gly Arg Pro Ser Pro Gly Pro Pro Ala Pro  
 106 110 115 120  
 Glu Gln Leu Leu Ser Gln Ala Arg Asp Phe Ile Asn Gln Tyr Tyr  
 121 125 130 135  
 Ser Ser Ile Lys Arg Ser GLys er Gln Ala His Glu Gln Arg Leu  
 10 136 140 145 150  
 Gln Glu Val Glu Ala Glu Val Ala Ala Thr Gly Thr Tyr Gln Leu  
 151 155 160 165  
 Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala Lys Gln Ala Trp Arg Asn  
 166 170 175 180  
 15 Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Gly Lys Leu Gln Val  
 181 185 190 195  
 Phe Asp Ala Arg Asp Cys Arg Ser Ala Gln Glu Met Phe Thr Tyr  
 196 200 205 210  
 Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly Asn Leu Arg  
 20 211 215 220 225  
 Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Cys Pro Gly Arg Gly Asp  
 226 230 235 240  
 Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr Arg  
 241 245 250 255

ES 2 440 393 A2

Gln Gln Asp GLy Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile  
 256 260 265 270  
 Thr Glu Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg  
 271 275 280 285  
 5 Phe Asp Val Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Glu Pro Pro  
 286 290 295 300  
 Glu Leu Phe Leu Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu  
 301 305 310 315  
 Glu His Pro Thr Leu Glu Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp  
 10 316 320 325 330  
 Tyr Ala Leu Pro Ala Val Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly  
 331 335 340 345  
 Leu Glu Phe Pro Ala Ala Pro Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr  
 346 350 355 360  
 15 Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile  
 361 365 370 375  
 Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp Leu Asp Thr Arg Thr Thr  
 376 380 385 390  
 Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val Glu Ile Asn Val Ala  
 20 391 395 400 405  
 Val Leu His Ser Tyr Gln Leu Ala Lys Val Thr Ile Val Asp His  
 406 410 415 420  
 His Ala Ala Thr Ala Ser Phe Met Lys His Leu Glu Asn Glu Gln  
 421 425 430 435

ES 2 440 393 A2

Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile Val Pro  
 436 440 445 450  
 Pro Ile Ser GLys er Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met Val  
 451 455 460 465  
 5 Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp  
 466 470 475 480  
 Lys Gly Ser Ala Ala Lys Gly Thr Gly Ile Thr Arg Lys Lys Thr  
 481 485 490 495  
 Phe Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser Leu Met  
 10 496 500 505 510  
 Gly Thr Val Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Gly  
 511 515 510 525  
 Ser Glu Thr Gly Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu Gly Arg  
 526 530 535 540  
 15 Leu Phe Arg Lys Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu  
 541 545 550 555  
 Tyr Asp Val Val Ser Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val  
 556 560 565 570  
 Thr Ser Thr Phe Gly Asn Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Ser  
 20 571 575 580 585  
 Phe Ala Ala Ala Leu Met Glu Met Ser Gly Pro Tyr Asn Ser Ser  
 586 590 595 600  
 Pro Arg Pro Glu Gln His Lys Ser Tyr Lys Ile Arg Phe Asn Ser  
 601 605 610 615



ES 2 440 393 A2

Ile Ser Cys Ser Asp Pro Leu Val Ser Ser Trp Arg Arg Lys Arg  
616 620 625 630

Lys Glu Ser Ser Asn Thr Asp Ser Ala Gly Ala Leu Gly Thr Leu  
631 635 640 645

5 Arg Phe Cys Val Phe Gly Leu GLys er Arg Ala Tyr Pro His Phe  
646 650 655 660

Cys Ala Phe Ala Arg Ala Val Asp Thr Arg Leu Glu Glu Leu Gly  
661 665 670 675

10 Gly Glu Arg Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Asp Glu Leu Cys Gly  
676 680 685 690

Gln Glu Glu Ala Phe Arg Gly Trp Ala Gln Ala Ala Phe Gln Ala  
691 695 700 705

Ala Cys Glu Thr Phe Cys Val Gly Glu Asp Ala Lys Ala Ala Ala  
706 710 715 720

15 Arg Asp Ile Phe Ser Pro Lys Arg Ser Trp Lys Arg Gln Arg Tyr  
721 725 730 735

Arg Leu Ser Ala Gln Ala Glu Gly Leu Gln Leu Leu Pro Gly Leu  
736 740 745 750

Ile His Val His Arg Arg Lys Met Phe Gln Ala Thr Ile Arg Ser  
20 751 755 760 765

Val Glu Asn Leu Gln Ser Ser Lys Ser Thr Arg Ala Thr Ile Leu  
766 770 775 780

Val Arg Leu Asp Thr Gly Gly Gln Glu Gly Leu Gln Tyr Gln Pro  
781 785 790 795

ES 2 440 393 A2

Gly Asp His Ile Gly Val Cys Pro Pro Asn Arg Pro Gly Leu Val  
 796 800 805 810  
 Glu Ala Leu Leu Ser Arg Val Glu Asp Pro Pro Ala Pro Thr Glu  
 811 815 820 825  
 5 Pro Val Ala Val Glu Gln Leu Glu Lys Gly Ser Pro Gly Gly Pro  
 826 830 835 840  
 Pro Pro Gly Trp Val Arg Asp Pro Arg Leu Pro Pro Cys Thr Leu  
 841 845 850 855  
 Arg Gln Ala Leu Thr Phe Phe Leu Asp Ile Thr Ser Pro Pro Ser  
 10 856 860 865 870  
 Pro Gln Leu Leu Arg Leu Leu Ser Thr Leu Ala Glu Glu Pro Arg  
 871 875 880 885  
 Glu Gln Gln Glu Leu Glu Ala Leu Ser Gln Asp Pro Arg Arg Tyr  
 886 890 895 900  
 15 Glu Glu Trp Lys Trp Phe Arg Cys Pro Thr Leu Leu Glu Val Leu  
 901 905 910 915  
 Glu Gln Phe Pro Ser Val Ala Leu Pro Ala Pro Leu Leu Leu Thr  
 916 920 925 930  
 Gln Leu Pro Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Val Ser Ser Ala  
 20 931 935 940 945  
 Pro Ser Thr His Pro Gly Glu Ile His Leu Thr Val Ala Val Leu  
 946 950 955 960  
 Ala Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Leu Gly Pro Leu His Tyr Gly Val  
 961 965 970 975

ES 2 440 393 A2

Cys Ser Thr Trp Leu Ser Gln Leu Lys Pro Gly Asp Pro Val Pro  
 976 980 985 990  
 Cys Phe Ile Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro Asp Pro  
 991 995 1000 1005  
 5 Ser Leu Pro Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro  
 1006 1010 1015 1020  
 Phe Arg Gly Phe Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu Ser Lys  
 1021 1025 1030 1035  
 Gly Leu Gln Pro Thr Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Cys  
 10 1036 1040 1045 1050  
 Ser Gln Leu Asp His Leu Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asn Ala Gln  
 1051 1055 1060 1065  
 Gln Arg Gly Val Phe Gly Arg Val Leu Thr Ala Phe Ser Arg Glu  
 1066 1070 1075 1080  
 15 Pro Asp Asn Pro Lys Thr Tyr Val Gln Asp Ile Leu Arg Thr Glu  
 1081 1085 1090 1095  
 Leu Ala Ala Glu Val His Arg Val Leu Cys Leu Glu Arg Gly His  
 1096 1100 1105 1110  
 Met Phe Val Cys Gly Asp Val Thr Met Ala Thr Asn Val Leu Gln  
 20 1111 1115 1120 1125  
 Thr Val Gln Arg Ile Leu Ala Thr Glu Gly Asp Met Glu Leu Asp  
 1126 1130 1135 1140  
 Glu Ala Gly Asp Val Ile Gly Val Leu Arg Asp Gln Gln Arg Tyr  
 1141 1145 1150 1155

ES 2 440 393 A2

His Glu Asp Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr Gln Glu Val Thr

1156                    1160                    1165                    1170

Ser Arg Ile Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu Arg Gln Leu

1171                    1175                    1180                    1185

5 Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Ser Asp Thr

1186                    1190                    1195                    1200

Asn Ser Pro

1201    1203

10 Para obtener anticuerpos policlonales contra la NO sintasa, también es posible utilizar un fragmento de la NO sintasa, seleccionado, por ejemplo, de las siguientes secuencias:

SEQ ID NO: 3

Pro Trp Ala Phe

1192                    1195

SEQ ID NO: 4

15 Gly Ala Val Pro

1189                    1192

SEQ ID NO: 5

Arg

1185

20 His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro

1186                    1190                    1195                    1200

Asp Thr Pro Gly Pro

1201                    1205

SEQ ID NO: 6

Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro

11941195 1200

Asp Thr Pro Gly Pro

1201 1205

5 SEQ ID NO: 7

His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp

1186 1190 11951196

SEQ ID NO: 8

His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro

10 1186 1190 1195 1200

Asp Thr Pro Gly Pro

1201 1205

15 El procedimiento de ejemplo para la preparación de los anticuerpos policlonales de partida contra la NO sintasa puede ser descrito de la siguiente manera. En 7-9 días antes de la toma de muestras de sangre, se ponen a los conejos 1-3 inyecciones intravenosas del antígeno deseado para aumentar el nivel de anticuerpos policlonales en el flujo de sangre del conejo. Tras la inmunización, se toman muestras sanguíneas para poner a prueba el nivel de anticuerpos. Por lo general, el nivel máximo de la reacción inmunológica del antígeno soluble se alcanza en 40 a 60 días después de la primera inyección del antígeno. Una vez finalizado el ciclo de la primera inmunización, los conejos tienen un período de rehabilitación de 30 días, tras lo cual se lleva a cabo la re-inmunización con otras 1-3 inyecciones intravenosas.

20 Para obtener un antisuero que contiene los anticuerpos deseados, la sangre de los conejos inmunizados se recoge de los conejos y se coloca en un tubo de centrifuga de 50 ml. Los coágulos de producto que se forman a los lados del tubo se retiran con una espátula de madera, y se coloca una barra dentro del coágulo en el centro del tubo. La sangre se coloca en un refrigerador durante una noche a la temperatura de aproximadamente 40° C. Al día siguiente, se retira el coágulo en la espátula, y el resto del líquido se centrifuga durante 10 minutos a 13.000 revoluciones por minuto. El fluido sobrenadante es el antisuero objetivo. El antisuero obtenido generalmente es de color amarillo. Se añade al antisuero 25 20% de NaN<sub>3</sub> (concentración en peso) hasta una concentración final de 0,02% y se almacenan antes de su uso en estado de congelación a una temperatura de -20° C con o sin NaN<sub>3</sub> a una temperatura de -70° C. Para separar los anticuerpos objetivo contra el interferón gamma del antisuero, la siguiente secuencia de absorción en fase sólida es adecuada:

30 10 ml de antisuero de conejo se diluyen dos veces con NaCl 0,15 M, después de lo cual se añaden 6,26 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se mezcla y se incuba durante 12-16 horas a 4° C. El sedimento se separa por centrifugación, se diluye en 10 ml de solución amortiguadora de fosfato y se dializa contra la misma solución amortiguadora durante una noche a temperatura ambiente. Después de que el sedimento se retira, la solución se aplica a una columna de DEAE-celulosa equilibrada con solución amortiguadora de fosfato. La fracción de anticuerpo se determina midiendo la densidad óptica del eluato a 280 nm.

35 Los anticuerpos crudos aislados se purifican mediante el método de cromatografía afín uniendo los anticuerpos obtenidos a NO sintasa localizada en la matriz insoluble de los medios de cromatografía, con posterior elución con soluciones salinas acuosas concentradas.

La solución amortiguadora resultante se utiliza como solución inicial para el proceso de dilución homeopática utilizado para preparar la forma activada potenciada de los anticuerpos. La concentración preferida de la solución de la matriz

inicial de los anticuerpos policlonales de conejo contra la NO sintasa purificados mediante antígeno es de 0,5 a 5,0 mg/ml, preferiblemente, 2,0 a 3,0 mg/ml.

Los anticuerpos policlonales contra la molécula biológica endógena también se pueden obtener por una metodología similar a la metodología descrita para los anticuerpos contra la NO sintasa endotelial usando un adyuvante.

- 5 La solución amortiguadora resultante se utiliza como solución inicial para el proceso de dilución homeopática utilizado para preparar la forma activada potenciada de los anticuerpos.

10 La forma activada potenciada de cada componente de la combinación puede ser preparada a partir de una solución inicial por potenciación homeopática, utilizando preferentemente el método de disminución proporcional de la concentración mediante dilución seriada de 1 parte de cada solución anterior (comenzando con la solución inicial) en 9 partes (para la dilución decimal), o en 99 partes (para la dilución centesimal), o en 999 partes (para la dilución milesimal) de un disolvente neutro, comenzando con una concentración de la solución inicial de anticuerpos en el disolvente, preferiblemente, agua o una mezcla de agua y alcohol etílico, en el rango de 0,5 a 5,0 mg/ml, junto con un impacto externo. Preferiblemente, el impacto externo implica la agitación vertical múltiple (dinamización) de cada dilución. Preferiblemente, se utilizan contenedores separados para cada dilución posterior hasta el nivel de potencia, o el factor de dilución, requeridos. Este método es bien aceptado en el arte de la homeopatía. Véase, por ejemplo, V. Schwabe "*Homeopathic medicines*", M., 1967, p. 14-29, que se incorpora por referencia al presente documento para el propósito indicado.

20 Por ejemplo, para preparar una dilución 12-centesimal (denominado C12), una parte de la solución de la matriz inicial de anticuerpos contra la NO sintasa con la concentración de 3,0 mg/ml se diluye en 99 partes de disolvente neutro acuoso o acuoso-alcohólico (de preferencia, alcohol etílico al 15%) y luego se agita verticalmente muchas veces (10 y más) para crear la 1ª dilución centesimal (denominada C1). La 2ª dilución centesimal (C2) se prepara a partir de la primera dilución centesimal (C1). Este procedimiento se repite 11 veces para preparar la 12ª dilución centesimal C12. Así, la 12ª dilución centesimal C12 representa una solución obtenida mediante 12 diluciones seriadas de una parte de la solución de la matriz inicial de los anticuerpos con la concentración de 3,0 mg/ml en 99 partes de un disolvente neutro en diferentes contenedores, lo que es equivalente a la centésima dilución homeopática C12. Para obtener la diluciones deseadas se llevan a cabo procedimientos similares con el factor de dilución correspondiente. Las diluciones intermedias pueden ser probadas en un modelo biológico deseado para comprobar la actividad. Las formas activadas potenciadas preferidas de anticuerpos que comprenden la combinación de la invención son diluciones C12, C30 y C200 para cada forma activada potenciada. Cuando se utiliza la mezcla de varias diluciones homeopáticas (principalmente centesimales) de la sustancia activa como componente líquido biológicamente activo, cada componente de la composición (por ejemplo, C12, C30, C50, C200) se prepara por separado de acuerdo con el procedimiento antes descrito hasta que se obtiene la dilución anterior a la última (por ejemplo, hasta C11, C29 y C199, respectivamente), y luego una parte de cada componente se agrega a un contenedor de acuerdo con la composición de la mezcla y se mezcla con la cantidad necesaria del disolvente (por ejemplo, con 97 partes para la dilución centesimal).

35 Es posible el uso de la sustancia activa como mezcla de varias diluciones homeopáticas, por ejemplo, decimal y/o centesimal (D20, C30, C100 o C12, C30, C50 o C12, C30, C200, etc.), la eficiencia de las cuales se determina experimentalmente mediante pruebas de la dilución en un modelo biológico adecuado, por ejemplo, en los modelos descrito en los ejemplos que este documento contiene.

40 En el curso de la potenciación y disminución de la concentración, la agitación vertical puede ser sustituida por la exposición externa a los ultrasonidos, campos electromagnéticos o cualquier otro procedimiento similar de impacto externo aceptado en el arte de la homeopatía.

45 La forma unitaria sólida de dosificación de la composición farmacéutica de la invención puede ser preparada mediante el uso de la impregnación de un vehículo sólido farmacéuticamente aceptable con la mezcla de las soluciones acuosas o acuosas-alcohólicas de formas activadas potenciadas de los componentes activos que se mezclan, principalmente en una relación 1:1, y ser utilizada en una forma líquida de dosificación. Alternativamente, el vehículo puede ser impregnado consecutivamente con cada dilución necesaria.

50 Preferiblemente, la composición farmacéutica en la forma unitaria sólida de dosificación es preparada a partir de gránulos del vehículo farmacéuticamente aceptable, que fue previamente saturado con las diluciones acuosas o acuosas-alcohólicas de la forma activada potenciada de los anticuerpos. La forma sólida de dosificación puede estar en cualquier forma conocida en la técnica farmacéutica, incluyendo un comprimido, una cápsula, una pastilla oral, y otros. Como ingredientes farmacéuticos inactivos se puede utilizar glucosa, sacarosa, maltosa, almidón, isomaltosa, isomalt y otros mono, oligo y polisacáridos utilizados en la fabricación de productos farmacéuticos, así como mezclas tecnológicas de los ingredientes farmacéuticos inactivos antes mencionados con otros excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, isomalt, crospovidona, ciclamato sódico, sacarina sódica, ácido cítrico anhidro, etc.), incluidos los lubricantes, disgregantes, aglutinantes y agentes colorantes. Los vehículos preferidos son lactosa e isomalt. La forma farmacéutica de

dosificación puede además incluir excipientes farmacéuticos estándar, por ejemplo, celulosa microcristalina, estearato de magnesio y ácido cítrico.

El ejemplo de preparación de la forma unitaria sólida de dosificación se expone a continuación. Para preparar la forma oral sólida, se impregnan gránulos de lactosa de 100-300 µm con soluciones acuosas o acuosas-alcohólicas de la forma activada potenciada de anticuerpos contra la histamina, la forma activada potenciada de anticuerpos contra la NO sintasa y la forma activada potenciada de anticuerpos contra una molécula biológica endógena en la proporción de 1 kg de solución de anticuerpos por cada 5 ó 10 kg de lactosa (1:5 a 1:10). Para llevar a cabo la impregnación, los gránulos de lactosa son expuestos saturación por irrigación en un lecho fluido en ebullición en una planta de lecho en ebullición (por ejemplo, "Hüttlin Pilotlab" por Hüttlin GmbH) con posterior secado a través de flujo de aire caliente a una temperatura por debajo de 40° C. La cantidad estimada de los gránulos secos (10 a 34 partes en peso) saturada con la forma activada potenciada de anticuerpos se coloca en la mesa de mezclas, y se mezcla con 25 a 45 partes en peso de lactosa pura no saturada (utilizado con los propósitos de reducción de costes y simplificación y aceleración de los procesos tecnológicos sin disminuir la eficiencia del tratamiento), junto con 0,1 a 1 partes en peso de estearato de magnesio, y de 3 a 10 partes en peso de celulosa microcristalina. La masa de comprimido obtenida se mezcla de manera uniforme, y se convierte en comprimidos por prensado directo en seco (por ejemplo, en una prensa de comprimidos Korsch - XL 400), para formar píldoras redondas de 150 a 500 mg, preferentemente, 300 mg. Después de formar los comprimidos, se obtienen píldoras de 300 mg que están saturadas con una solución acuosa-alcohólica (3,0-6,0 mg/píldora) de la combinación de la forma activada potenciada de anticuerpos. Cada componente de la combinación utilizada para impregnar el vehículo está en forma de una mezcla de diluciones homeopáticas centesimales, de preferencia, C12, C30 y C200.

Aunque la invención no se limita a ninguna teoría específica, se cree que la forma activada potenciada de los anticuerpos descritos en este documento no contiene la forma molecular del anticuerpo en una cantidad suficiente para tener la actividad biológica atribuida a tal forma molecular. La actividad biológica de la combinación de fármacos (composición farmacéutica combinada) de la invención es ampliamente demostrada en los ejemplos adjuntos.

Preferentemente, a los efectos del tratamiento, la combinación de la invención se administra de una vez al día a cuatro veces al día, preferiblemente dos veces al día, incluyendo cada administración una o dos formas unitarias combinadas de dosificación.

La invención se ilustra además con referencia a los ejemplos adjuntos no limitantes.

## Ejemplos

### Ejemplo 1.

Estudio del efecto de una preparación compleja que contiene dosis ultrabajas (ULD) de la forma activada potenciada de anticuerpos policlonales de conejo purificados por afinidad contra la proteína específica del cerebro S-100 (anti-S100) y la NO sintasa endotelial (anti-eNOS), obtenidos por superdilución de la solución de la matriz inicial (concentración: 2,5 mg/ml) ( $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{200}$  veces), lo que equivale a una mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200 (relación 1:1) (ULD de anti-S100 + anti-eNOS), así como sus componentes – la forma activada potenciada de anticuerpos policlonales de conejo purificados por afinidad a dosis ultrabajas (ULD) contra la proteína específica del cerebro S-100 (anti-S100), purificados sobre el antígeno, obtenido por superdilución de la solución de la matriz inicial ( $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{200}$  veces, lo que equivale a una mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200, y de la forma activada potenciada de anticuerpos policlonales de conejo a dosis ultrabajas de la NO sintasa endotelial (ULD de anti-eNOS), obtenido por superdilución de la solución de la matriz inicial ( $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{200}$  veces), lo que equivale a una mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200 in vitro, sobre la unión del ligando estándar [ $^3$ H]pentazocina al receptor  $\sigma 1$  humano recombinante evaluado mediante el método de radioligandos. Se utilizó agua destilada potenciada (mezcla de diluciones homeopáticas C12 + C30 + C200) se como control de las preparaciones ensayadas.

El receptor sigma-1 ( $\sigma 1$ ) – un receptor intracelular que se localiza en las células del sistema nervioso central, las células de la mayoría de los tejidos periféricos y células del componente inmune. Los receptores presentan una capacidad única para su translocación, que es causada por muchos medicamentos psicotrópicos. La dinámica de los receptores sigma-1 está directamente relacionada con diversas influencias que son ejercidas por las preparaciones que actúan sobre los receptores sigma-1. Estos efectos incluyen la regulación de los canales de actividad, exocitosis, transferencia de la señal, la remodelación de la membrana plasmática (formación de balsas) y transporte / metabolismo de lípidos. Todo esto puede contribuir a la plasticidad de las neuronas en el cerebro. Hay evidencias de que los receptores sigma-1 tienen un efecto modulador sobre todos los sistemas principales de neurotransmisores: noradrenérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, colinérgicos y NMDA con efectos ajustables del glutamato. El receptor Sigma-1 juega un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, Parkinson), trastornos psiquiátricos y afectivos y accidentes cerebrovasculares; y también participa en los procesos de

aprendizaje y la memoria. En este sentido, la capacidad de los fármacos para influir sobre la eficiencia de la interacción de ligandos del receptor sigma-1 indica la presencia de componentes neuroprotectores, anti-isquémicos, ansiolíticos, antidepresivos y antiasténicos en el espectro de su actividad farmacológica que permite la consideración de estos fármacos como preparaciones efectivas particularmente para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares.

- 5 Durante la prueba (para medir la unión total) 20 µl de la preparación de complejos de ULD de anti-S100 + anti-eNOS o 10 µl de ULD de AB contra la S100 o 10 µl de ULD de AB contra NOS fueron transferidos al medio de incubación. Por lo tanto, la cantidad de ULD de anti-S100 + anti-eNOS, transferidos al recipiente de ensayo para probar la preparación de complejos fue idéntica a la de ULD de AB contra la S100 y ULD de AB contra NOS ensayados como monopreparaciones, lo que permite comparar la eficiencia de la preparación con respecto a sus componentes por separado. 20 µl y 10 µl de agua potenciada fueron también transferidos al medio de incubación.

Además, fueron transferidos 160 µl (aproximadamente 200 µg de proteína) de homogeneizado de membranas de la línea celular Jurkat (línea de linfocitos T de leucemia humana), y finalmente, 20 µl del radioligando marcado con tritio [<sup>3</sup>H]pentazocina (15 nm).

- 15 Para medir la unión no específica, 20 µl del ligando haloperidol no marcado (10 µM) fueron transferidos al medio de incubación en lugar de las preparaciones o el agua potenciada.

La radiactividad se midió utilizando un contador de centelleo (TopCount, Packard) y una mezcla de centelleo (Microscint 0, Packard) después de la incubación durante 120 minutos a 22° C en tampón Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4) y la filtración utilizando filtros de fibra de vidrio (GF/B, Packard). La unión específica (durante la prueba o en el control) se calculó como la diferencia entre el total (durante la prueba o en el control) y uniones no específicas.

- 20 Los resultados se representan como porcentaje de inhibición de la unión específica en el control (se utilizó como control agua destilada) (Tabla 1).

Tabla 1.

Grupo de Prueba	Cantidad por recipiente de ensayo	% de la unión específica de radioligandos en el control			% de inhibición de unión de radioligandos en el control
		1ra Prueba	2da Prueba	Promedio	
ULD de anti-S100+anti-eNOS	20 µl	48,4	35,5	42,0	58,0
ULD de anti-S100	10 µl	67,3	63,1	65,2	34,8
ULD de anti-eNOS	10 µl	147,5	161,1	154,3	-54,3
Agua Potenciada	20 µl	98,1	75,8	86,9	13,1
Agua Potenciada	10 µl	140,1	106,2	123,2	-23,2

Efecto de las preparaciones y del agua potenciada en la unión del ligando estándar [<sup>3</sup>H]pentazocina al receptor σ 1 humano recombinante.

- 25 Nota: % de unión específica en el control = (unión específica durante la prueba / unión específica en el control) \* 100%;

% de inhibición de la unión específica en el control = 100% - (unión específica durante la prueba / unión específica en el control) \* 100%).

- 30 Los resultados que reflejan inhibición por encima del 50% representan efectos significativos de los compuestos ensayados; la inhibición entre el 25% y el 50% confirma efectos de leves a moderados; la inhibición de menos del 25% se considera un efecto insignificante del compuesto ensayado y se encuentra dentro del nivel del fondo.



Por lo tanto, las condiciones de este modelo de ensayo demostraron que la preparación de complejos de ULD de anti-S100 + anti-eNOS es más eficiente que sus componentes por separado (ULD de anti-S100 y ULD de anti-eNOS) en la inhibición de la unión del radioligando estándar [<sup>3</sup>H]pentazocina al receptor  $\sigma$ 1 humano recombinante; ULDs de anti-S100, transferidas al recipiente de ensayo, es decir, 10  $\mu$ l, inhiben la unión del radioligando estándar [<sup>3</sup>H]pentazocina al receptor  $\sigma$ 1 humano recombinante, pero la intensidad del efecto es inferior a la de la preparación de complejos de ULDs de anti-S100 + anti-eNOS; ULDs de anti-eNOS, transferidas al recipiente de ensayo, es decir, 10  $\mu$ l, no tuvieron ningún efecto sobre la unión del radioligando estándar [3H]pentazocina al receptor  $\sigma$ 1 humano recombinante; el agua potenciada, transferida al recipiente de ensayo, es decir, 10  $\mu$ l o 20  $\mu$ l, no tuvo ningún efecto sobre la unión del radioligando estándar [3H]pentazocina al receptor  $\sigma$ 1 humano recombinante.

## 10 Ejemplo 2

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la disminución de las funciones cognitivas, deterioro de la memoria, conciencia confusa, y los cambios emocionales. Aunque la principal causa de esta patología hoy en día se considera que es la acumulación de beta-amiloide que conduce a la formación de placas beta-amiloides y ovillos neurofibrilares en los tejidos del cerebro; la EA también está acompañada por una deficiencia del sistema colinérgico. Esta es la base de la forma más común de obtener modelos de la EA en animales con la ayuda de antagonistas del sistema colinérgico de la escopolamina. La inyección de escopolamina en animales de experimentación (generalmente ratas o ratones) interrumpe la capacidad de aprender y conduce a un deterioro de la memoria.

Se utilizaron varios métodos para evaluar las funciones cognitivas de ratas y ratones, incluyendo el laberinto acuático de Morris. La esencia de esta prueba es que los animales liberados en un recipiente con agua turbia desde diferentes puntos se ven obligados a buscar una plataforma fija oculta. La ventaja de este método es que permite al investigador supervisar el proceso de adiestramiento de animales (la formación de ideas acerca de la alineación espacial de la plataforma, sin importar dónde se colocó el animal en el agua) a fin de evaluar la fuerza de la memoria (para lo cual esta prueba se lleva a cabo cuando la plataforma se retira).

Se estudió en ratas con amnesia provocada por escopolamina la efectividad de la composición de combinación farmacéutica de la presente invención que contiene formas activadas potenciadas de anticuerpos policlonales de conejo purificados por afinidad por el antígeno contra proteínas específicas del cerebro S-100 (anti-S100) y contra la NO sintasa endotelial (anti-eNOS) en dosis ultrabajas (ULD) obtenidas por superdilución de la solución madre almacenada (con una concentración de 2,5 mg/ml) en 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup>, 100<sup>200</sup> veces, lo que equivale a diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200 (ULD anti-S100 + anti-eNOS).

En un estudio de la eficacia del fármaco ULD de anti-S100 + anti-eNOS en las ratas con amnesia provocada por escopolamina (un modelo de la enfermedad de Alzheimer) fueron utilizadas 48 ratas macho de la línea Rj: Wistar (Han) (peso de 180-280 g). Durante 4 días, las ratas fueron inyectadas subdérmicamente con solución salina normal (n = 12, intacta) o con escopolamina en dosis de 0,5 mg / kg (n = 36) (amnesia inducida por escopolamina). Las ratas con amnesia inducida por escopolamina se dividieron en tres grupos y se les administró agua destilada (7,5 ml / kg, n = 12, grupo de control 1), o ULD de anti-S100 (7,5 ml / kg, n = 12, grupo 2) o ULD de anti-S100 + anti-eNOS (7,5 ml / kg, n = 12, grupo 3) intragástricamente durante 9 días (4 días antes de la inyección de escopolamina, 4 días en el contexto de la escopolamina y 1 día después la última inyección de escopolamina).

La sesión de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris se llevó a cabo dentro de los 4 días siguientes a la inyección de escopolamina durante 60 minutos tras la administración de los fármacos probados y 30 minutos después de la administración de la escopolamina (4 pruebas secuenciales a intervalos de 60 segundos). El Laberinto de Morris es un depósito redondo (diámetro - 150 cm, altura - 45 cm) lleno de agua (26-28° C) hasta la altura de 30 cm. A 18 cm desde el borde del recipiente existe una plataforma oculta (diámetro - 15 cm) enterrados a 1,5 cm por debajo del nivel del agua. El agua turbia preparada mediante la adición de un colorante no tóxico (por ejemplo, leche en polvo) hace la plataforma invisible. Para cada prueba el animal fue colocado en un laberinto en uno de los puntos iniciales que se encuentran equidistantes de la plataforma oculta, y al animal se le permitió encontrar la plataforma. Si el animal no podía encontrar la plataforma en 120 segundos, el animal era colocado en la plataforma, dejándole ahí durante 60 segundos, y la prueba se reiniciaba. Durante las cuatro pruebas en orden aleatorio, los animales comenzaron a caminar por el laberinto dos veces desde cada punto de partida. Las pruebas fueron grabadas en vídeo y luego se analizaron tomando en cuenta la distancia recorrida por los animales buscando la plataforma en cada ensayo y el período de latencia de búsqueda de la plataforma. El día 5 se realizó la prueba: la plataforma fue retirada del laberinto y a las ratas se les dejó flotar libremente durante 60 segundos. Se registró el tiempo de permanencia en el lugar donde la plataforma solía estar.

La administración de escopolamina empeoró considerablemente la capacidad de los animales para aprender. En el grupo control el tiempo dedicado por los animales a buscar las plataformas y la distancia que los animales recorrieron nadando en busca de la plataforma, aumentó significativamente (Tablas 2, 3). La prueba muestra que la memoria de los animales del grupo control empeoró: los animales de este grupo pasaron menos tiempo en el lugar donde la plataforma solía estar

5 ubicada que los animales intactos (Tabla 4). La administración de ULD de anti-S100 no se tradujo en una mejora de los parámetros estudiados (Tablas 2, 3, 4). La administración de ULD anti-S100 + anti-eNOS dio lugar a una cierta mejora en el aprendizaje de la que resultó una reducción del tiempo de latencia del tiempo de búsqueda de la plataforma (Tabla 2) y la distancia recorrida (Tabla 3) dentro de los 4 días de entrenamiento y una mejora de la memoria tal como se refleja en el aumento del tiempo empleado en un lugar donde la plataforma solía estar ubicada (Tabla 4).

Tabla 2.

Período de latencia de búsqueda de la plataforma, segundos.

Grupo	Entrenamiento			
	1er día	2do día	3er día	4to día
Intacto, n=12	54,7±6,2	30,8±2,8	26,9±5,1	20,5±3,6
Control, n=12	100,1±6,8***	92,4±9,3***	81,4±10,7***	77,7±9,4***
ULD anti-S100, n=12	106,8±7,0	99,3±7,8	95,6±9,0	80,4±11,1
ULD anti-S100 + anti-eNOS, n=12	94,4±7,2	90,7±8,2	78,3±8,6	60,1±10,2

\*\*\* - La diferencia con respecto al intacto es significativa,  $p < 0,05$

10

Tabla 3.

Distancia recorrida en busca de la plataforma, centímetros.

Grupo	Entrenamiento			
	1er día	2do día	3er día	4to día
Intacto, n=12	1055,7±94,6	659,5±62,2	564,8±119,3	406,1±61,2
Control, n=12	2587,1±217,2***	2559,6±250,5***	2397,9±312,6	2366,1±293,8***
ULD anti-S100, n=12	2797,2±208,9	2865,2±255,1	2857,0±300,8	2457,4±344,4
ULD anti-S100 + anti-eNOS, n=12	2434,3±222,8	2529,9±282,7	2344,2±283,0	1905,1±343,7

\*\*\* - La diferencia con respecto al intacto es significativa,  $p < 0,05$

Tabla 4.

15

Tiempo de permanencia en el lugar donde la plataforma solía estar ubicada, segundos

Grupo	Prueba		
	0-30 seg.	30-60 seg.	0-60 seg.
Intacto, n=12	40,8±4,1	36,8±3,6	38,5±2,6
Control, n=12	18,4±2,8***	18,8±1,9***	18,8±1,7***
ULD anti-S100, n=12	13,3±2,1	21,5±2,6	17,6±1,3
ULD anti-S100 + anti-eNOS, n=12	19,1±4,8	23,8±2,2	21,2±2,5

\*\*\* - La diferencia con respecto al intacto es significativa,  $p < 0,05$

Por lo tanto, en el modelo de la enfermedad de Alzheimer, la administración del complejo ULD de anti-S100 + anti-eNOS fue más eficaz en comparación con la administración de ULD de anti-S100 y el vehículo.

### Ejemplo 3.

5 La investigación preclínica estudió las dosis ultrabajas (ULD) de las formas activadas potenciadas de anticuerpos policlonales de conejo purificados por afinidad contra la proteína específica del cerebro S-100 (anti-S100) purificados sobre el antígeno, y la NO sintasa endotelial (anti-eNOS), obtenidos por superdilución de la solución de la matriz inicial (concentración: 2,5 mg/ml) ( $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{200}$  veces), lo que equivale a una mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200 (proporción 1:1) (ULD de anti-S100 + anti-eNOS) en el tratamiento del infarto isquémico causado por fototrombosis cerebrocortical prefrontal en ratas.

10 La enfermedad cerebrovascular aguda (infarto cerebral) ocupa el tercer lugar entre las causas de letalidad en los países desarrollados y es una de las principales causas de discapacidad en los seres humanos (*Gusev IE, 2003; Janardhan V., Qureshi IA, 2004*).

15 El modelo de trombosis fotoinducida cumple casi todos los requisitos para ser modelo experimental de isquemia cerebral focal. El método desarrollado por Watson (*Watson B. et al., 1985*) se basa en el efecto de la luz con longitud de onda de 560 nm sobre el pigmento fotosensible Rosa de Bengala introducido en el flujo sanguíneo. Se crean formas activas de oxígeno y se causa un aumento de la adhesividad de las células endoteliales y plaquetas, y la formación de coágulos que cierran los lúmenes vasculares. El método de inducción de lesión cerebral isquémica mediante el uso de trombosis fotoinducida es técnicamente sencillo y cercano a las formas clínicas del infarto cerebral isquémico. Una gran ventaja de este modelo es que no es invasivo, es decir, no requiere una craneotomía y, por tanto, reproduce con mayor precisión el cuadro clínico de la trombosis cerebral.

20 Treinta y siete ratas Wistar macho (peso: 150 a 180 g, edad: 2-3 meses) se incluyeron en el estudio de la actividad de ULD de anti-S100 + anti-eNOS en ratas con accidente cerebrovascular isquémico causado por fototrombosis cerebrocortical prefrontal. Se indujeron lesiones bilaterales isquémicas focales en la corteza prefrontal cerebral en ratas utilizando el método de la trombosis fotoquímica de Watson (*Watson BD et al., 1985*), modificado por I.V. Viktorov (*Romanova G.A. et al, 1998*). Se inyectó Rosa de Bengala (solución al 3%) en la vena yugular de ratas anestesiadas (n = 37) (anestesia: hidrato de cloral 300 mg/kg, por vía intraperitoneal). Usando un haz de fibras ópticas (3 cm de diámetro), se aplicó el haz de luz de una lámpara halógena (24 V, 250 W) a la superficie del cráneo por encima de la corteza frontal de los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo para inducir fototrombosis. Se sometió al mismo procedimiento a ratas falsamente operadas (n = 6), excepto la administración de rosa de Bengala y la exposición a la luz halógena. El grupo intacto incluía 6 ratas.

25 Cinco días antes y 9 días después de la inducción del infarto se administraron las siguientes preparaciones a ratas con fototrombosis: agua destilada (control-fototrombosis, 5 ml/kg al día, n = 12), ULD de anti-S100 (5 ml/kg al día, n = 7) o ULD de anti-S100 + anti-eNOS (5 ml/kg al día, n = 6). En el día 8 después de la operación (o de la operación simulada) se realizó una prueba de evitación pasiva refleja condicionada (CPAR) para evaluar la capacidad de aprendizaje y la memoria en ratas. Las ratas fueron colocadas en una unidad que consiste en un sitio iluminado y una cámara oscura conectada, donde los animales fueron expuestos a descargas eléctricas en los pies de 0,45 mA debido a lo cual la cámara oscura que habitualmente se prefería se convirtió en una zona peligrosa. El desarrollo del reflejo condicionado de evitación pasiva se puso a prueba al día siguiente. En ese momento, las ratas fueron colocadas en la cámara iluminada. Se registró el periodo de latencia de la primera entrada en la cámara oscura. Si una rata evitaba la cámara oscura durante mucho tiempo, se llegó a la conclusión de que recordaba el peligro (descargas eléctricas). Cuanto más largo era el periodo de latencia de entrada en la cámara oscura, mejor era la memoria.

30 En el día 9 se evaluó morfológicamente el volumen de la lesión isquémica en una proporción de las ratas de los grupos experimentales.

35 En las ratas control, la fototrombosis causó la formación de una gran zona infartada y, por tanto, produjo un deterioro de la memoria: la reproducción del CPAR empeoró un 9,6% en comparación con las ratas intactas y en un 22,9% en comparación con las de operación simulada (Tabla 5). La administración de ULD de anti-S100 redujo el volumen infartado en un 42,2% y mejoró la memoria en un 14,0% en comparación con el grupo de control-fototrombosis. La administración de ULD de anti-S100 + anti-eNOS fue más efectiva: el volumen infartado se redujo en un 44,0%, y la reproducción del reflejo condicionado - en un 33,4% en comparación con el grupo de control-fototrombosis.

40 Por lo tanto, la administración de la preparación de complejos de ULD de anti-S100 + anti-eNOS fue más eficaz que la preparación de un solo componente de ULD de anti-S100.

Tabla 5.

	Volumen de infarto cerebral focal (mm <sup>3</sup> ); número de animales	Período de latencia de CPAR (segundos); número de animales
Intactos	-	135,8 ± 28,8; n=6
Operaciones Simuladas	-	159,3 ± 18,7; n=6
Control Fototrombosis	3,41 ± 0,5; n=9	122,8 ± 20,9; n=12
Fototrombosis + ULD anti-S100	1,97 ± 0,6; n=4	140,0 ± 26,5; n=7
Fototrombosis + ULD anti-S100+anti-eNOS	1,91 ± 0,5; n=4	163,8 ± 16,2; n=6

**Ejemplo 4.**

5 Estudio de la combinación de formas activadas potenciadas de anticuerpos frente a un fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II, en una mezcla de diluciones homeopáticas de C12, C30, C200, con la forma activada potenciada de anticuerpos contra la NO sintasa endotelial, en una mezcla de diluciones homeopáticas de C12, C30, C200, en ratas SHR en un modelo de hipertensión.

10 Se estudió la combinación de la forma activada potenciada de anticuerpos frente a un fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II, en una mezcla de diluciones homeopáticas de C12, C30, C200, y la forma activada potenciada de anticuerpos contra la NO sintasa endotelial en una mezcla de diluciones homeopáticas de C12, C30, C200, en forma de solución, en el modelo de hipertensión de ratas SHR. Las investigaciones se llevaron a cabo en 40 ratas macho de la línea SHR (peso 350±50 g, edad 4,5 a 5 meses) con hipertensión, que fueron divididos en 4 grupos de 10 animales cada uno.

15 Durante 28 días, los animales fueron tratados de la siguiente manera. Grupo 1 - 2,5 ml / kg de la forma activada potenciada de anticuerpos contra un fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II humano (una mezcla de disoluciones acuosas C12, C30, C200) en combinación con 2,5 ml/kg de agua destilada, el Grupo 2 – 2,5 ml/kg de la forma activada potenciada de anticuerpos contra la NO sintasa endotelial (una mezcla de disoluciones acuosas C12, C30, C200) en combinación con 2,5 ml/kg de agua destilada, Grupo 3 - 5 ml/kg de la composición farmacéutica combinada (una mezcla de disoluciones acuosas C12, C30, C200 para cada componente), y Grupo 4 - 5 ml/kg de agua destilada.

20 La presión arterial sistólica (PAS) de las ratas despiertas se midió con la ayuda de un método indirecto en una arteria de la cola (con un manguito) una vez por semana y 9 horas después de la última administración de los medicamentos.

25 Todas las composiciones analizadas presentaron efecto hipotensor ( $p < 0,05$ ): en el día 28, la presión arterial sistólica (PAS) se redujo en comparación con el nivel inicial en el Grupo 1 en un 20,6%; en el Grupo 2 en un 14,4%, en el Grupo 3 en un 27,6%. En el Grupo 4 de control, los cambios en la PAS fueron del 1,6% en comparación con los valores iniciales. Los resultados demuestran un claro efecto sinérgico hipotensor de la composición de combinación farmacéutica.

**Ejemplo 5.**

30 Estudio de la combinación de las formas activadas potenciada de anticuerpos contra un fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II, en una mezcla de diluciones homeopáticas de C12, C30, C200, con la forma activada potenciada de anticuerpos contra la NO sintasa endotelial, en una mezcla de diluciones homeopáticas de C12, C30, C200, en ratas NISAG en un modelo de hipertensión.

35 Se estudió la combinación de la forma activada potenciada de anticuerpos contra un fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II, en una mezcla de diluciones homeopáticas de C12, C30, C200, y la forma activada potenciada de anticuerpos contra la NO sintasa endotelial en una mezcla de las diluciones homeopáticas de C12, C30, C200, en forma de solución, en el modelo de ratas NISAG con hipertensión. Las investigaciones se llevaron a cabo en 50 ratas machos de la línea NISAG (peso 300 g, 4 meses de edad) con hipertensión arterial hereditaria estipulada como sensible al estrés, que se dividieron en 5 grupos de 10 animales cada uno.

Los animales recibieron por vía oral, una vez al día y durante 28 días, las siguientes medicaciones: Grupo 1 - 2,5 ml/kg de la forma activada potenciada de anticuerpos contra un fragmento C-terminal del receptor de la angiotensina II humano (una mezcla de diluciones C12, C30, C200) en combinación con 2,5 ml/kg de agua destilada; Grupo 2 – 2,5 ml/kg de la

forma activada potenciada de anticuerpos contra la NO sintasa endotelial (una mezcla de diluciones C12, C30, C200) en combinación con 2,5 ml/kg de agua destilada; Grupo 3 - 5 ml/kg de la composición de combinación farmacéutica (una mezcla de diluciones acuosas homeopáticas C12, C30, C200 de cada componente), Grupo 4 - 5 ml/kg (10 ml/kg por dosis) del fármaco de comparación (losartan) y el Grupo de 5 - 5 ml/kg de agua destilada.

- 5 Dos veces a la semana, de 2 a 6 horas después de la administración de anticuerpos VSD y losartán, la presión arterial sistólica (PAS) se midió por un método indirecto en una arteria de la cola (con un manguito). La Tabla 6 muestra la dinámica de los cambios en la presión arterial sistólica en ratas de la línea NISAG, medida por el método indirecto.

Tabla 6.

Indicador	PAS Inicial en mmHg	PAS después de 28 días de la administración de la medicina en mm Hg	$\Delta$ en comparación con el nivel inicial, en mm Hg	% con respecto al nivel inicial
Anticuerpos VSD contra un fragmento C-terminal del receptor de la angiotensina II humano	176	150	-26	-14,7%
Anticuerpos VSD contra la NO sintasa endotelial	175	164,5	-10,5	-6%
Medicina combinada basada en anticuerpos VSD contra un fragmento C-terminal del receptor de la angiotensina II humano y contra la NO sintasa endotelial.	179,5	140	-39,5	-22%
Losartan	173,5	140,5	-33	-19%
Control (agua destilada)	181	178	-3	-1,6%

10 **Ejemplo 6.**

El estudio experimental investigó los efectos de anticuerpos contra el fragmento C-terminal de la subunidad  $\beta$  del receptor de la insulina purificados por afinidad por el antígeno, en dosis ultrabajas, obtenidas por superdilución de la solución de matriz inicial  $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{200}$  veces (ULD de anti-IR), anticuerpos contra la NO sintasa endotelial purificados por afinidad por el antígeno, a dosis ultrabajas, que se obtienen por hiperdilución de la solución de la matriz inicial de  $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{200}$  (ULD de anti-ULD anti-eNOS), así como la combinación de dosis ultrabajas de anticuerpos contra el fragmento C-terminal de la subunidad  $\beta$  del receptor de la insulina y dosis ultrabajas de anticuerpos contra la NO sintasa endotelial (ULD de anti-IR + ULD de anti-eNOS).

15 En el estudio fueron utilizados 150 machos Wistar (peso al inicio del estudio de 250-300 g, edad 3,5 - 4 meses). 10 ratas quedaron intactas. Al resto se le inyectó por vía intravenosa estreptozotocina a una dosis de 50 mg/kg (modelo experimental de diabetes mellitus). 72 horas después de la inyección de estreptozotocina, se seleccionaron las ratas con niveles de glucosa en el plasma sanguíneo de no menos de 12 mmol/l, se dividieron en 7 grupos (20 ratas en cada uno), a los cuales se les administró durante más de 21 días agua destilada (5 ml/kg/día, una vez al día por vía intragástrica), insulina® (8 unidades/kg/día, por vía subcutánea), rosiglitazona® (8 mg/kg/día, dos veces al día por vía intragástrica), ULD de anti-IR (2,5 ml/kg/día en un volumen de 5 ml/kg/día, una vez al día por vía intragástrica), ULD de anti-IR + ULD de anti-eNOS (5 ml/kg/día, una vez al día por vía intragástrica), y también insulina® y rosiglitazona® juntas o ULD de anti-IR + ULD de anti-eNOS e insulina®, de acuerdo con los regímenes correspondientes a cada preparación (como se describió anteriormente). Las ratas intactas recibieron agua destilada en el mismo volumen. En los días 7, 14 y 21 de inyección de preparados en las ratas, se midieron los niveles de glucosa en plasma sanguíneo en ayunas con el método enzimático (método de la glucosa oxidasa) con la utilización de kits "glucosa FDK" (Rusia).

30 La prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) se llevó a cabo el día 14 del estudio (día 14 de administración de la preparación) de acuerdo con el método estándar (Du Vigneaud y Karr, 1925). Las ratas se las privó de comida y las

5 mantuvo con agua durante 18 horas. 60 minutos antes de la prueba se les dio el último lote de sustancias de prueba. Las ratas intactas recibieron agua destilada en el mismo volumen. La glucosa se administró por vía oral como solución de glucosa en agua al 50% p/p (1 g/kg de peso del animal). La glucosa en el suero de las muestras de sangre de la vena de la cola se midió mediante el uso del kit "glucosa FKD" (OOO "Pharmaceutical and clinical diagnostics, Rusia, www.fkd.ru) a los 0, 30, 60, 90, 120 min. Se calculó el área media bajo la curva de la concentración de glucosa en sangre a lo largo del tiempo.

10 La inyección de estreptozotocina llevó a un aumento sustancial de la glucosa en el plasma sanguíneo de las ratas en comparación con los animales intactos (18 mmol/l frente a 3,5 mmol/l,  $p < 0,05$ ). En el grupo de ULD de anti-IR, en el día 7, 14 y 21 de inyección de la preparación, el nivel de glucosa fue menor que en el grupo control en un 22 a 28% en promedio; sin embargo, las diferencias no llegaron a un nivel estadísticamente significativo. La combinación de ULD de anti-IR y anti eNOS fue más eficaz; la disminución del nivel de glucosa en los días 14 y 21 del experimento fue del 47% y 42%, respectivamente ( $p < 0,05$  frente a control). La preparación de referencia, la rosiglitazona, también redujo los niveles de glucosa en el día 14 y 21 del experimento; el efecto alcanzó significación estadística en el día 14 del experimento (36%,  $p < 0,05$  frente al control).

15 La insulina, inyectada usando la mitad de la dosis efectiva (seleccionada en el estudio preliminar) fue lo más efectivo a la hora de disminuir el nivel de glucosa en todos los períodos de observación (hasta el nivel del control intacto). (Figura 1). Hay que tener en cuenta que se utilizó en el estudio insulina de acción a corto plazo y que la glucosa en la plasma sanguíneo se midió una hora después de su inyección, lo que también influyó en el efecto de la semidosis de insulina en el nivel de glucosa en sangre. En este contexto, no fue posible determinar plenamente cuál es el efecto del uso  
20 combinado de insulina y rosiglitazona o de insulina y el complejo de ULD de anti-IR + anti eNOS

25 La alteración de la tolerancia a la glucosa (disminución de la utilización de glucosa por el cuerpo) es uno de los indicadores más importantes en el diagnóstico y el tratamiento de la diabetes mellitus. En los animales intactos, en la prueba de tolerancia a la glucosa oral (día 14 de la inyección de preparaciones), la preparación de complejos de ULD de anti-IR + ULD de anti-eNOS y la insulina fueron lo que incrementaron de forma más eficiente la tolerancia a la glucosa cuando se administró sola. La rosiglitazona también redujo el área bajo la curva de concentración a lo largo del tiempo (mayor tolerancia a la glucosa), sin embargo, su eficacia no fue estadísticamente significativa frente al grupo control (Figura 2).

### Ejemplo 7.

30 El estudio experimental investigó los efectos de anticuerpos contra el fragmento C-terminal de la subunidad  $\beta$  del receptor de la insulina purificado por afinidad por el antígeno, a dosis ultrabajas, que se obtienen por superdilución de la solución de matriz inicial  $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{200}$  veces (ULD de anti-IR), de anticuerpos contra la NO sintasa endotelial purificado por afinidad por el antígeno, a dosis ultrabajas, que se obtienen por la hiperdilución de la solución de la matriz inicial  $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{200}$  (ULD fr anti-ULD anti-eNOS), así como la combinación de dosis ultrabajas de anticuerpos contra el fragmento C-terminal de la subunidad  $\beta$  del receptor de la insulina y dosis ultrabajas de anticuerpos contra la NO sintasa  
35 endotelial (ULD de anti-IR + ULD de anti-eNOS).

40 En el estudio fueron utilizadas 36 ratas machos Goto-Kakizaki (peso al inicio del estudio de 250-280 g, edad: 10-12 semanas). Las ratas de esta línea se caracterizan por el desarrollo espontáneo de diabetes no dependiente de insulina. Los animales fueron divididos en 3 grupos (12 ratas en cada uno) y recibieron agua destilada (5 ml/kg una vez al día por vía intragástrica), o ULD de anti-IR (2,5 ml/kg una vez al día por vía intragástrica), o ULD de anti-IR + ULD de anti-eNOS (5 ml/kg una vez al día por vía intragástrica) durante 28 días. El nivel de glucosa en el plasma sanguíneo se midió con la ayuda de un analizador de glucosa (Beckman, Fullerton, California, EE.UU.) antes de la inyección de las preparaciones y en los días 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 de inyección de las preparaciones. En el día 28, se llevó a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa (glucosa por vía oral, 1 g/kg).

45 La inyección de ULD de anti-IR llevó a una caída significativa ( $p < 0,05$ ) del nivel de glucosa en el plasma sanguíneo de las ratas, sin embargo, la utilización de complejos ULD de anti-IR + ULD de anti-eNOS fue más eficaz ( $p < 0,001$  frente al control) (Figura 3).

50 Los resultados fueron confirmados por los datos de la prueba de tolerancia a la glucosa realizada en el día 28 de inyección de preparaciones (Figura 4). La inyección de ULD de anti-IR llevó a un aumento en la tolerancia a la glucosa (caída estadísticamente significativa en un 44% del AUC frente al control). Al mismo tiempo, la reducción de este parámetro (AUC), causada por la inyección del complejo de ULD de anti-IR + ULD de anti-eNOS fue del 62% y fue estadísticamente significativa frente al control ( $p < 0,05$ ).

**Ejemplo 8.**

Se usaron las preparaciones siguientes: comprimidos de 300 mg impregnados con una solución acuosa-alcohólica (3 mg/comprimido) de una forma activada potenciada de anticuerpos policlonales de conejo contra proteínas específicas del cerebro S-100, purificado sobre el antígeno, a dosis ultrabaja (ULD de anti-S100) recibido por superdilución de la solución inicial (con una concentración de 2,5 mg/ml) 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup>, 100<sup>200</sup> veces, equivalente a la mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200; comprimidos de 300 mg impregnados con una composición farmacéutica que contenía soluciones acuosas-alcohólicas (6 mg/comprimido) de una forma activada potenciada de anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína específica del cerebro S-100 (anti S-100) y contra eNOS (anti-eNOS) a dosis ultrabaja (ULD), recibido por superdilución de la solución inicial (con una concentración de 2,5 mg/ml) 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup>, 100<sup>200</sup> veces, equivalente a la mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200; (ULD de anti-S100+anti-eNOS), comprimidos de 300 mg impregnados con una solución acuosa-alcohólica (3 mg/comprimido) de una forma activada potenciada de anticuerpos policlonales de conejo contra eNOS purificados sobre el antígeno a dosis ultrabajas (ULD de anti-eNOS), recibido por superdilución de la solución inicial (con una concentración de 2,5 mg/ml) 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup>, 100<sup>200</sup> veces, equivalente a la mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200; y como placebo comprimidos de 300 mg que contienen excipientes: lactosa (lactosa monohidrato) - 267 mg, celulosa microcristalina - 30 mg, estearato de magnesio - 3 mg.

La eficacia de los fármacos estudiados en el tratamiento de los vahídos (vértigo) y otros síntomas de mareo por movimiento se evaluó en el modelo de cinetosis o enfermedades del movimiento / mareo por movimiento que se produce por diversos trastornos vegetativos vestibulares. El vahído es el signo típico de la lesión del analizador vestibular de génesis diversa incluyendo la alteración del nervio vestibular y el sistema coclear, la perturbación de la circulación en el sistema vertebrobasilar, patologías del sistema nervioso central (SNC), etc. El vahído es una manifestación de la cinetosis acompañada de otros trastornos vegetativos vestibulares que incluyen tres tipos de reacciones: vestibulo-motoras (nistagmo y la reacción de desviación), vestibulo-sensoriales (además de los vahídos, el nistagmo, reacciones postrotatorias, movimientos defensivos) y vegetativas (náuseas, vómitos, sudoración, palpitaciones, sensación de calor, fluctuaciones del pulso y la presión arterial).

Se llevó a cabo un estudio comparativo controlado de placebo doble ciego en grupos paralelos, que consistían en 15 sujetos somáticamente sanos - hombres y mujeres de edades comprendidas entre 15 y 60 años (edad media, 33,3 ± 0,75 años) con un grado de resistencia al mareo por movimiento bajo (n = 5; 33%) o medio (n = 10; 67%) para poner a prueba las propiedades contra el mareo por movimiento de diversas composiciones. El Grupo 1 recibió ULD de anti-S100 + anti-eNOS, al Grupo 2 se le dio ULD de anti-S100 y al Grupo 3 se le dio anti-eNOS.

Para simular la condición de la enfermedad de movimiento y evaluar la efectividad de los fármacos estudiados se utilizaron los modelos de cinetosis más apropiados y reconocidos – la prueba con un efecto acumulativo continuo de aceleraciones de Coriolis (CCEAC). La tolerancia inicial a la prueba CCEAC en todas las sujetos en estudio no fue de más de 5 minutos. Los trastornos vegetativos vestibulares provocados por efecto cinético (CCEAC) se registraron con el uso de métodos de diagnóstico complejos, incluido el examen del sujeto, la evaluación cuantitativa de los trastornos de la sensibilidad vestibulo-vegetativa (escala de Halle), el análisis de la variabilidad del ritmo cardíaco (VRC), y la autoestima del estado funcional (WBAM - bienestar, actividad y estado de ánimo). Como criterios de eficacia de la terapia conducida se evaluaron la dinámica de la tolerancia y la extensión del período de recuperación a la influencia cinética, así como la alteración de los índices de evidencias de reacciones senso-motoras (nistagmo), los índices de VRC (con el uso del sistema Biocom Wellness Scan, desarrollado por AWS, LLC, de acuerdo con la Norma Internacional de la Asociación Europea de cardiólogos y la Asociación de Electrofisiología de América del Norte) y los datos de WBAM. Los criterios de seguridad fueron el carácter, las pruebas y las condiciones de aparición de eventos adversos (EA) probables en el período de tratamiento relacionado con la ingesta de medicación; la influencia de los fármacos estudiados sobre los índices que caracterizan la función del sistema nervioso central (SNC) (reacción ante un objeto en movimiento (ROM)), el tiempo de reacción motora simple (TRMS), la dinámica de los factores físicos y funcionales (frecuencia cardíaca (FC), presión arterial sistólica y diastólica (PAS, PAD), prueba de Stange; la tolerancia al ejercicio (índice de la prueba del escalón de Harvard). La seguridad se evaluó después de la administración de una dosis única y después de la administración durante 7 días de la combinación de ULD de anti-S-100 y ULD de anti-eNOS.

Ninguno de los sujetos había tomado fármaco alguno durante un mes antes de participar en el estudio. Después de la selección de los sujetos los mismos fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos (Grupo 1 - ULD de anti-S100+anti-eNOS, Grupo 2 - ULD de anti-S100, Grupo 3 - ULD de anti-eNOS, y Grupo 4 - placebo).

En el primer día del estudio (Visita 1) se registró el estado inicial funcional y psicofisiológico de los sujetos, a los sujetos se les dieron cinco comprimidos de las respectivas ULD de anticuerpos, seguido de la administración de la prueba CCEAC. Se registró la duración de la prueba; se detectaron los trastornos vegetativos vestibulares y EAs relacionados con el mareo por movimiento con la ayuda de un examen diagnóstico complejo. En los siguientes 2-6 días se le dio a los sujetos un comprimido tres veces al día del fármaco prescrito. En el 7º día (Visita 2) a los sujetos se les dio la misma dosis

5 que el primer día (Visita 1). El complejo de estudios diagnósticos se llevó a cabo antes y después de la prueba CCEAC. El estudio se organizó de tal manera como si la plantilla del estudio sólo trabajara con un individuo. El estudio se llevó a cabo en paralelo y se efectuó en la primera mitad del día con la participación de, por regla general, cuatro personas por día, una persona por fármaco o placebo. Las tres semanas siguientes fueron el período de limpieza del organismo, al final del cual se recetó el medicamento nuevo o un placebo a los sujetos de cada grupo; se repitió el ciclo de estudios (Visita 1, el curso de la ingesta de un medicamento; Visita 2). Así, durante el estudio cada sujeto tomó parte en cuatro ciclos de estudio. Es decir, cada sujeto participó en cada grupo con un periodo de limpieza de tres semanas entre cada ciclo. Esto permitió a los investigadores evaluar el nivel de influencia de las particularidades individuales de cada persona en estudio sobre el efecto del tratamiento. El análisis de la eficiencia de los fármacos se llevó a cabo sobre los datos de todos los sujetos en estudio que completó el ciclo completo de ingesta del fármaco estudiado de acuerdo con el protocolo del estudio (n = 15).

15 Los factores que evidencian los síntomas de mareo por movimiento (vértigo, náuseas, falta de actividad, palidez, sudoración, etc.), después de influencia cinética (CCEAC) frente al contexto de un solo día de ingesta de los fármacos estudiados demostró que todos los sujetos del estudio obtuvieron básicamente el mismo estado de mareo por movimiento en tanto en cuanto la evidencia de síntomas de disfunción vegetativa evaluados en la escala de Halle por el médico-investigador no diferían significativamente en todos los grupos (Tabla 7, Visita 1). Sin embargo, mientras tanto el efecto cinético que causa síntomas similares de mareo por movimiento fue diferente en cuatro grupos y fue dependiente del fármaco ingerido por los sujetos del estudio (Tabla 8, Visita 1). La ingesta de un día de la preparación de ULD de anti-S100 + anti-eNOS dio lugar al efecto más claro contra el mareo por movimiento lo cual se puso de manifiesto no sólo en un tiempo de tolerancia significativamente mayor de la prueba CCEAC ( $104,10 \pm 13,14$  segundos frente a  $68,50 \pm 6,57$  segundos - en el grupo de ULD de anti-S100;  $75,00 \pm 6,79$  segundos - en el grupo de ULD de anti-eNOS; y  $61,30 \pm 3,15$  segundos - en el grupo placebo), sino también en el tiempo de nistagmo más corto ( $9,90 \pm 1,20$  segundos frente a  $13,50 \pm 1,51$ ;  $16,10 \pm 1,68$  y  $13,30 \pm 1,12$  segundos, respectivamente) y en una recuperación rápida máxima ( $96,90 \pm 13,54$  segundos frente a  $194,20 \pm 18,45$ ;  $202,50 \pm 21,72$  y  $241,70 \pm 38,41$  segundos, respectivamente).

25 En la Visita 2 se registraron Índices más o menos similares después de recibir un tratamiento de fármacos. Para lograr los síntomas similares al mareo por movimiento (Tabla 7, Visita 2) se aplicó el mayor tiempo de impacto cinético a los sujetos que habían estado recibiendo la composición de ULD de anti-S100 + anti-eNOS (Tabla 8, Visita 2) durante 7 días. Un tiempo significativamente menor de nistagmo ( $9,50 \pm 1,38$  seg,  $p < 0,01$ ) y la duración del período de recuperación ( $117,90 \pm 15,65$  segundos,  $p < 0,01$ ) indicaron que la composición de ULD de anti-S100 + anti-eNOS tenía el efecto más pronunciado contra el mareo por movimiento. La preparación de un solo componente de ULD de anti-S100 tuvo también una acción contra el mareo por movimiento como evidenciaron mejores índices de tolerancia de la prueba CCEAC, de tiempo de recuperación del nistagmo y de recuperación que en el grupo placebo (Tabla 8, Visitas 1 y 2), pero la eficacia de ULDs de anti-S100 fue inferior a la de la composición de ULD de anti-S100 + anti-eNOS. La preparación de un solo componente de ULD de anti-eNOS no mostró efecto contra el mareo por movimiento, ya que los resultados de las pruebas de CCEAC y el período de recuperación posterior no tenían diferencias significativas con el grupo placebo (Tabla 8, Visitas 1 y 2). El análisis comparativo de los índices de prueba CCEAC en los grupos de ULD de anti-S100 + anti-eNOS y ULD de anti-S100 en un solo día de ingesta de los fármacos demostró que la adición de ULD de anti-eNOS aumentó la tolerancia al efecto cinético en un 52%, redujo el tiempo de nistagmo en un 27% y contribuyó a la reducción del período de recuperación después del final del efecto cinético en un 50%, incluyendo la duración de los mareos - en 49%. Sin embargo, la mayor contribución del componente de ULD de anti-eNOS introducido en la eficacia de la preparación combinada (composiciones de ULD anti-S100 + anti-eNOS) en el transcurso de la ingesta de un fármaco se expresó superando en más de un 30% los resultados obtenidos en el grupo de ULD de anti-S100 en los factores de tolerancia al efecto cinético y duración de nistagmo (en cada uno de los parámetros). Además, en la Visita 2 se manifestó en mayor grado el crecimiento del efecto de los de índices de tolerancia de la prueba CCEAC y la duración del nistagmo en relación con los datos de la Visita 1, cuando se ingirió la composición de ULD de anti-S100 + anti-eNOS en comparación con la preparación de un solo componente de ULD de anti-S100, según se vio confirmado por la alteración de estos índices en un 30% y el 4% (frente al 21% y 0% en el grupo de ULD de anti-S100). Al evaluar la eficacia contra el mareo por movimiento de las propiedades de los fármacos se prestó especial atención a los posibles efectos de los fármacos en la estabilidad del sistema nervioso autónomo (SNA), en particular, al cambio en el equilibrio entre sus divisiones simpática y parasimpática. Para ello, en cada visita se analizó cada uno de los parámetros de la VRC en el estado de reposo y al realizar las pruebas funcionales (pruebas de respiración y ortostáticas).



Tabla 7.

Índices de la escala de Halle dependiendo de la preparación aplicada después de la realización de la prueba CCEAC

Preparación	Escala de Halle (puntos)	
	Visita 1 (Un día de ingesta) (n=15; M±SE)	Visita 2 (Trancurso de la Ingesta) (n=15; M±SE)
ULD de anti-S100 + anti-eNOS	12,00±0,63	12,30±0,59
ULD de anti-S100	13,30±0,65	12,30±0,46
ULD de anti-eNOS	13,10±0,78	12,00±0,55
Placebo	13,40±0,77	13,30±0,45

5

Tabla 8

La dinámica de los índices de la prueba CCEAC en función de la preparación aplicada

Preparación	Visita 1 (Un día de ingesta)		
	Tolerancia a la prueba CCEAC, segundos (n=15; M±DS)	Tiempo de nistagmo, segundos (n=15; M±DS)	Tiempo de Recuperación, segundos. (n=15; M±DS)
ULD anti-S100 + anti-eNOS	104,10±13,14 **	9,90±1,20 *	96,90±13,54 ***
ULD anti-S100	68,50±6,57 ×	13,50±1,51	194,20±18,45 ×××
ULD anti-eNOS	75,00±6,79	16,10±1,68	202,50±21,72 ×××
Placebo	61,30±3,15	13,30±1,12	241,70±38,41
Valor P en la prueba de Kruskal-Wallis <sup>1</sup>	0,0182	0,0658	0,0001
Visita 2 (Ingesta en curso)			
ULD anti-S100 + anti-eNOS	134,70±20,24 **	9,50±1,38 **	117,90±15,65 **
ULD anti-S100	82,70±10,33	13,50±1,69	167,50±14,72 ×
ULD anti-eNOS	74,30±9,49 ×	17,30±2,40 ×××	209,20±21,62 ××
Placebo	63,70±3,91	15,00±1,47	199,60±31,19
Valor P en la prueba de Kruskal-Wallis <sup>1</sup>	0,0341	0,0244	0,0061

Notas:

10 <sup>1</sup> para la determinación de diferencias significativas entre los grupos se usó la prueba de Kruskal-Wallis Si:

la prueba mostró una diferencia significativa de  $p < 0,05$  comparando grupos entre sí

se usó la prueba de Mann-Whitney.

\* diferencia significativa en comparación con el placebo,  $p < 0,05$ ;

\*\* diferencia significativa en comparación con el placebo,  $p < 0,01$ ;

\*\*\* diferencia significativa en comparación con el placebo,  $p < 0.001$ .

5 <sup>x</sup> diferencia significativa en comparación con ULD de anti-S100 + anti-eNOS,  $p < 0,05$ ;

<sup>xx</sup> diferencia significativa en comparación con ULD de anti-S100 + anti-eNOS,  $p < 0,01$ ;

<sup>xxx</sup> diferencia significativa en comparación con ULD de anti-S100 + anti-eNOS,  $p < 0.001$ .

10 El análisis de la VRC en el estado de reposo (en posición sentada) antes y después de la prueba CCEAC (Tabla 9) detectó que los sujetos que recibieron fármacos del estudio tenían una tendencia a una mayor tasa de SDNN que indica un aumento en la variabilidad del ritmo cardíaco debido a la influencia parasimpática en el ritmo cardíaco. En respuesta a un efecto cinético el valor de RMS-SD se incrementó en todos los grupos de tratamiento lo que caracteriza la actividad del componente parasimpático de la regulación autonómica. En los grupos que recibieron la composición de ULD de anti-S100 + anti-eNOS y ULD de anti-S100 mostraron un aumento en la insuficiencia cardíaca que también indica un cambio en el equilibrio autonómico hacia el vínculo parasimpático. Así, después de la realización de pruebas CCEAC en todos los grupos hubo un aumento de efectos parasimpáticos sobre la frecuencia cardíaca.

Tabla 9.

**Los parámetros de la VFC de los participantes en el estudio en reposo  
antes y después de la acción cinética**

Parámetro	Visita 1 (Un día de ingesta)		Visita 2 (Transcurso de la ingesta)	
	Después de la ingesta de fármaco	Después de la prueba CCEAC	Después de la ingesta de fármaco	Después de la prueba CCEAC
<b>Grupo ULD de anti-S100 + anti-eNOS (M±DE)</b>				
SDNN, mseg.	57,7±5,51	68,2±7,42	59,4±5,03	65,6±4,66
RMSSD, mseg.	43,1±6,77	51,4±9,22	47,0±6,21	47,6±5,33
TP, mseg. <sup>2</sup>	979,0±186,06	1678,3±397,11#	1067,2±167,24	1381,0±166,30
LF, mseg. <sup>2</sup>	437,5±709,6	709,6±178,72	391,9±75,61	588,5±87,48
HF, mseg. <sup>2</sup>	171,5±51,08	228,4±76,79	206,5±58,32	218,5±43,96
LF/HF, u.c.	4,2±0,82	4,9±0,83	3,3±0,83	4,2±0,91
<b>Grupo de ULD anti-S100 (M±DE)</b>				
SDNN, mseg.	60,9±4,62	70,9±5,90	59,1±4,80	68,8±4,87
RMSSD, mseg.	44,3±5,39	50,6±6,56	42,4±4,63	47,8±5,57
TP, mseg. <sup>2</sup>	832,2±124,93*	1342,8±217,09	841,4±149,93	1288,0±163,52#
LF, mseg. <sup>2</sup>	315,2±52,38*	550,9±72,44#	313,6±66,71	540,7±87,57#
HF, mseg. <sup>2</sup>	151,4±41,19	247,0±69,53#	138,3±38,42	187,1±39,80
LF/HF, u.c.	3,0±0,54	4,0±0,72	2,8±0,53	4,0±0,52
<b>Grupo de ULD anti-eNOS (M±DE)</b>				
SDNN, mseg.	67,4±7,73	78,6±6,14	65,8±8,68	69,0±5,23

RMSSD, mseg.	53,0±8,86	58,4±7,68	59,6±12,45	52,2±5,30
TP, mseg. <sup>2</sup>	1307,8±324,24	1841,1±359,79#	1232,3±292,51	1275,4±172,47
LF, mseg. <sup>2</sup>	576,5±167,07	849,9±194,2#	527,2±167,07	562,1±89,38
HF, mseg. <sup>2</sup>	313,3±139,90	285,3±65,92	218,9±74,78	216,3±63,72
LF/HF, u.c.	3,6±0,87	3,9±0,82	3,7±1,14	3,8±0,58
<b>Grupo Placebo (M±DE)</b>				
SDNN, mseg.	64,6±6,10	75,7±6,42	61,1±6,72	70,8±6,79
RMSSD, mseg.	50,9±7,74	53,1±6,62	44,6±6,63	44,3±5,31
TP, mseg. <sup>2</sup>	1062,2±150,02	1917,8±318,96#	898,8±169,62	1418,5±227,59#
LF, mseg. <sup>2</sup>	440,6±77,30	832,4±181,15	334,8±75,94	611,4±113,64#
HF, mseg. <sup>2</sup>	253,9±59,95	266,7±61,94	166,0±48,14	174,1±44,96
LF/HF, u.c.	3,4±0,72	5,0±1,33	3,4±0,93	4,8±0,83

Nota: \* diferencia significativa en comparación con el placebo,  $p \leq 0,05$ );

# diferencia significativa en comparación con los valores basales,  $p \leq 0,05$ .

- 5 El análisis de la VFC en los estados de transición mostró que de un día de ingesta de la composición de ULD de anti-S100 + anti-eNOS aumentó el tiempo de reacción ( $13,9 \pm 1,14$ ,  $p \leq 0,05$ ) y el tiempo de estabilización ( $24,2 \pm 1,28$ ,  $p \leq 0,05$ ) en comparación con ULD de anti-S100 y el placebo. Los mismos factores superan el valor del grupo placebo y después del efecto cinético, lo cual demuestra el efecto positivo del fármaco combinado sobre la reactividad de la ANS (aumento de la tolerancia a los cambios en la posición del cuerpo). El hecho de que la diferencia entre la frecuencia cardíaca máxima y mínima en la prueba de respiración fuera la más pequeña confirmó un mejor equilibrio de las dos divisiones de la ANS después de recibir una composición durante un día de ULD de anti-S100 + anti-eNOS ( $25,1 \pm 2,66$  latidos / min,  $p \leq 0,05$ ). Al final de la semana de transcurso de la terapia el efecto estabilizador sobre el equilibrio del ANS después de la prueba CCEAC (con prueba ortostática y de respiración) se observó también en el grupo que recibió la composición de ULD de anti-S100 + anti-eNOS (Tablas 10 y 11).

**Tabla 10**

- 15 **Los parámetros de la VFC de los participantes del estudio en la prueba ortostática antes y después de la acción dinámica**

Parámetro	Visita 1 (Un día de ingesta)		Visita 2 (Ingesta en curso)	
	Después de la ingesta de fármaco	Después de la prueba CCEAC	Después de la ingesta de fármaco	Después de la prueba CCEAC
<b>Grupo ULD de anti-S100 + anti-eNOS (M±DE)</b>				
Reacción al ejercicio, u.c.	1,30±0,06	1,40±0,04	1,30±0,06	1,40±0,06
Tiempo de reacción, seg.	13,9±1,14* <sup>x</sup>	12,7±1,24*	11,8±0,57	11,7±1,09
Tiempo de estabilización, seg.	24,2±1,28* <sup>x</sup>	21,9±1,44*	20,6±0,74	22,4±1,44* <sup>x</sup>

<b>Grupo ULD anti-S100 (M±SD)</b>				
Reacción al ejercicio, u.c.	1,40±0,04	1,30±0,04	1,30±0,04	1,30±0,05
Tiempo de reacción, seg.	7,60±1,05	10,6±1,55	9,7±1,21	10,0±1,73
Tiempo de estabilización, seg.	15,1±1,16*	18,3±1,43	18,0±1,18	18,0±1,80
<b>Grupo ULD anti-eNOS (M±SD)</b>				
Reacción al ejercicio, u.c.	1,30±0,04	1,30±0,04	1,50 ± 0,12	1,30±0,04
Tiempo de reacción, seg.	8,20±0,94	9,10±1,12	9,2 ± 0,77	8,3±0,70
Tiempo de estabilización, seg.	16,5±1,02	17,1±1,33	19,0 ± 2,04	16,7±0,98
<b>Grupo Placebo (M±SD)</b>				
Reacción al ejercicio, u.c.	1,30±0,04	1,30±0,04	1,40 ± 0,06	1,30±0,06
Tiempo de reacción, seg.	9,5±1,28	8,1±0,90	10,4 ± 1,58	8,8±1,09
Tiempo de estabilización, seg.	18,3±0,94	16,8±1,09	18,0 ± 1,37	16,5±1,11

Nota: \* la diferencia significativa en comparación con el placebo,  $p \leq 0,05$ ;

<sup>x</sup> la diferencia significativa en comparación con ULD anti-S100,  $p \leq 0,05$ .

Tabla 11

**5 Los parámetros de la VFC de los participantes en el estudio en la prueba de aliento antes y después de la acción cinética**

Parámetro	Visita 1 (Un día de ingesta)		Visita 2 (Ingesta en curso)	
	Después de la ingesta de fármaco	Después de la prueba CCEAC	Después de la ingesta de fármaco	Después de la prueba CCEAC
<b>Grupo ULD anti-S100 + anti-eNOS (M±DE)</b>				
Correlación max FC / min FC, u.c.	1,5 ± 0,05*	1,5 ± 0,06	1,5 ± 0,05	1,5 ± 0,05
Diferencia max FC – min FC, pulsaciones/min.	25,1 ± 2,66*	26,5 ± 2,77	26,5 ± 2,37	24,9 ± 2,24*
<b>Grupo ULD anti-S100 (M±DE)</b>				
Correlación max FC / min FC, u.c.	1,5±0,06	1,6±0,05	1,5±0,04	1,6±0,06
Diferencia max FC – min FC,	27,7±2,68	27,2±2,40	25,7±2,24	26,9±2,67

pulsaciones/min.				
<b>Grupo ULD anti-eNOS (M±DE)</b>				
Correlación max FC / min FC, u.c.	1,5±0,05	1,5±0,04	1,5±0,06	1,6±0,05
Diferencia max FC – min FC, pulsaciones/min.	26,7±2,44	26,2±2,04	27,7±2,47	27,3±2,12
<b>Grupo Placebo (M±SD)</b>				
Correlación max FC / min FC, u.c.	1,6±0,07	1,6±0,06	1,5±0,05	1,6±0,05
Diferencia max FC – min FC, pulsaciones/min.	31,2±3,06	28,2±2,50	27,7±2,37	29,2±2,44

Nota: \* diferencia significativa en comparación con el placebo,  $p \leq 0,05$ );

Los resultados de la autoestimación del estado funcional (bienestar, actividad, estado de ánimo) de los sujetos que se llevaron a cabo por parte de los participantes en el estudio después del mareo por movimiento (pruebas CCEAC) al principio y al final del tratamiento mostraron que los sujetos de todos los grupos habían dado valores 'promedio' para cada uno de los parámetros (Tabla 12). Por lo tanto, en el contexto de la ingesta de fármacos la tolerancia CCEAC fue satisfactoria. En el grupo de la composición de ULD de anti-S100 + anti-eNOS se observaron las mayores tasas de crecimiento en comparación con los datos del grupo placebo al final del día séptimo de ingesta (más del 10%).

Tabla 12.

**La dinámica de los parámetros autoestimados de las condiciones funcionales (bienestar, actividad y el estado de ánimo) de los participantes en el estudio**

Parámetro	Visita 1 (Un día de ingesta)	Visita 2 (Ingesta en curso)
<b>Grupo ULD anti-S100 + anti-eNOS (M±DE)</b>		
<b>Bienestar</b>	4,3±0,26	4,6±0,27
<b>Actividad</b>	4,2±0,20	4,2±0,22
<b>Estado de Ánimo</b>	5,0±0,16	5,2±0,13
<b>Grupo ULD anti-S100 (M±DE)</b>		
<b>Bienestar</b>	3,7±0,21	4,3±0,22
<b>Actividad</b>	3,6±0,17	4,0±0,19
<b>Estado de Ánimo</b>	4,5±0,16	4,9±0,19
<b>Grupo ULD anti-eNOS (M±DE)</b>		
<b>Bienestar</b>	3,9±0,25	4,1±0,26
<b>Actividad</b>	3,8±0,25	3,9±0,23
<b>Estado de Ánimo</b>	4,4±0,19	4,6±0,19

<b>Grupo Placebo (M±DE)</b>		
<b>Bienestar</b>	4,0±0,24	4,0±0,24
<b>Actividad</b>	3,8±0,20	3,7±0,26
<b>Estado de Ánimo</b>	4,3±0,20	4,7±0,24

5 El análisis de seguridad incluyó datos de todos los sujetos que participaron en el estudio. Durante el período de observación se observó una buena tolerancia de las preparaciones estudiadas. No se identificaron eventos adversos asociados con la administración de fármacos. Todos los sujetos de los grupos estudiados completaron el tratamiento en los términos establecidos en el protocolo del estudio; no hubo personas que abandonaran temprano.

De acuerdo con los resultados del examen físico, incluyendo los indicadores de la frecuencia cardíaca, presión arterial sistólica y diastólica y de acuerdo con los datos de prueba del escalón de Harvard no se registró que los sujetos tuvieran ninguna anomalía durante el estudio (Tabla 13). Todos los cambios identificados no fueron más allá del rango normal. En este caso, todos los sujetos informaron subjetivamente de un bienestar satisfactorio.

10

Tabla 13.

**La dinámica de los parámetros físicos y tolerancia al ejercicio de los participantes en el estudio antes y después de la acción dinámica**

<b>Parámetros</b>	<b>Visita 1 (Un día de ingesta)</b>		<b>Visita 2 (Ingesta en curso)</b>	
	<b>Después de la ingesta de fármaco</b>	<b>Después de la prueba CCEAC</b>	<b>Después de la ingesta de fármaco</b>	<b>Después de la prueba CCEAC</b>
<b>Grupo ULD anti-S100 + anti-eNOS (M±DE)</b>				
FC (pulsaciones/min)	74,6±3,36	68,4±3,67	74,1±3,10	67,7±2,62
Presión arterial sistólica (mm Hg.)	123,4±2,83	125,9±4,08	121,8±2,65	128,3±4,25
Presión arterial diastólica (mm Hg.)	74,0±3,09	79,3±2,62	76,2±2,43	80,3±3,30
Índice de la prueba del escalón	–	53,6±2,60	–	52,3±2,09
<b>Grupo ULD anti-S100 (M±DE)</b>				
FC (pulsaciones/min)	73,5±2,57	69,7±2,78	72,1±2,84	67,7±2,39
Presión arterial sistólica (mm Hg.)	127,5±2,55	133,5±4,77	127,1±2,55	129,9±5,06
Presión arterial diastólica (mm Hg.)	75,5±2,65	82,6±3,31	74,9±2,41	82,3±3,19
Índice de la prueba del escalón	–	50,6±1,71	–	53,0±1,63
<b>Grupo ULD anti-eNOS (M±DE)</b>				
FC (pulsaciones/min)	76,5±2,59	67,3±1,98	77,3±2,02	70,1±3,23
Presión arterial sistólica	127,3±3,14	131,5±5,16	123,5±3,06	129,3±4,13

(mm Hg.)				
Presión arterial diastólica (mm Hg.)	75,2±2,24	80,3±2,66	73,9±2,83	81,0±3,22
Índice de la prueba del escalón	–	51,8±2,12	–	51,2±2,21
<b>Grupo Placebo (M±DE)</b>				
FC (pulsaciones/min)	74,5±2,78	68,9±3,46	73,9±3,23	72,3±3,58
Presión arterial sistólica (mm Hg.)	125,3±3,30	133,3±4,73	124,3±2,83	126,9±3,95
Presión arterial diastólica (mm Hg.)	76,2±2,15	81,7±2,83	75,4±1,86	79,7±3,03
Índice de la prueba del escalón	–	50,0±2,03	–	50,1±1,99

Además de los parámetros hemodinámicos, para la evaluación de la seguridad de los fármacos estudiados y su posible impacto negativo en las funciones del sistema nervioso central, se examinados en los sujetos los siguientes parámetros fisiológicos: (ROM (reacción ante un objeto en movimiento), TSRM (tiempo de reacción motora simple), RA (rango de atención), capacidad de atención (CA), y el factor de la estabilidad de la atención (FEA)). Además, se llevó a cabo la prueba de Stange para evaluar la tolerancia a la hipoxia.

De acuerdo con los resultados recibidos (Tabla 9) ni la ingesta de un solo día ni el transcurso de la ingesta de fármacos tuvo un efecto significativo en los parámetros estimados. Los índices de la coordinación senso-motora (TSRM, ROM) no difirieron de los resultados del grupo placebo antes y después de la prueba CCEAC en ambas visitas. Los datos del estudio de funciones complicadas tales como el volumen y la estabilidad de la atención mostraron que los fármacos estudiados, tanto antes como después de la prueba CCEAC, no cambiaron el grado de concentración y desplazamiento de la atención, no siendo diferente de la del grupo placebo.

El análisis de las pruebas estándar de esfuerzo con retención de la respiración mostró una tendencia al aumento de la tolerancia a la hipoxia de los sujetos (Tabla 14). Al contener la respiración la duración de la misma en la prueba de Stange creció después de tomar todos los fármacos del estudio. Sin embargo, sólo la ingesta de la composición de la combinación de ULD de anti-S100 + anti-eNOS mostraron un tiempo significativa más largo en la contención de la respiración después del efecto cinético (68,1 ± 18,8 segundos en la línea base y 91,7 ± 27,4 segundos después de la prueba CCEAC; p <0,05). El aumento de la tolerancia de la hipoxia se observó también cuando se utilizó la prueba de Gench (prueba de Stange) (contener la respiración al expirar, P > 0,05).

Tabla 14

**La dinámica de los parámetros del estado psicofisiológico de los participantes antes y después de la acción dinámica**

Parámetro	Visita 1 (Un día de ingesta)		Visita 2 (Ingesta en curso)	
	Después de la ingesta de fármaco	Después de la prueba CCECA	Después de la ingesta de fármaco	Después de la prueba CCECA
Grupo ULD anti-S100 + anti-eNOS (M±DE)				
TSRM	257,5±8,67	268,9±10,18	269,6±9,75	279,9±12,24
ROM, u.c.	50,1±3,92	49,5±4,50	47,3±4,86	47,0±3,54
ROM, % de alcance del objetivo	3,0±0,95	4,5±1,15	5,3±1,58	4,0±1,11

ES 2 440 393 A2

AS, seg,	5,2±0,34	5,2±0,35	5,2±0,41	5,1±0,40
Rango de atención, seg,	41,7±2,36	39,9±2,38	38,1±2,17	37,5±2,04
FSA	17,4±1,66	17,2±1,51	18,0±1,71	18,8±1,72
Prueba de Stange	68,1±4,85	91,7±7,07*	71,8±6,02	85,5±9,36
Prueba de Gench	47,1±4,03	50,1±3,94	46,7±3,28	48,1±4,52
Grupo ULD anti-S100 (M±SE)				
TSRM	258,9±9,95	282,4±13,56	268,4±11,37	279,1±9,20
ROM, u.c.	58,1±6,40	57,5±6,34	55,1±5,06	53,8±5,02
ROM, % de alcance del objetivo	3,7±1,50	2,0±0,82	2,3±0,83	5,0±1,69
AS, seg,	6,0±0,40	6,4±0,52	6,2±0,42	6,0±0,41
Rango de atención, seg,	42,6±2,68	42,1±2,27	42,7±2,30	41,9±2,52
FSA	14,5±1,16	14,9±1,26	15,3±1,13	15,4±1,18
Prueba de Stange	59,0±4,09	72,6±6,19	64,5±4,93	75,9±5,67
Prueba de Gench	47,1±4,48	49,4±4,69	48,3±4,30	48,8±4,14
Grupo ULD anti-eNOS (M±SE)				
TSRM	257,7±8,49	279,4±14,23	266,7±13,19	275,5±11,44
ROM, u.c.	48,3±3,67	51,9±4,39	52,5±4,79	49,6±4,22
ROM, % de alcance del objetivo	2,3±0,83	2,0±0,82	3,3±1,26	5,7±1,68
AS, seg,	5,9±0,25	6,0±0,34	5,5±0,24	5,9±0,33
Rango de atención, seg,	41,9±2,10	43,8±2,39	41,3±2,00	42,5±2,22
FSA	13,7±1,34	14,8±1,31	15,6±1,24	14,1±1,40
Prueba de Stange	62,5±5,49	69,5±5,09	56,7±3,34	73,1±7,98
Prueba de Gench	43,1±3,51	45,7±3,15	43,4±3,77	45,8±4,03
Grupo Placebo (M±SE)				
TSRM	267,6±7,64	290,1±11,33	281,1±9,78	263,3±6,85
ROM, u.c.	60,7±8,31	54,1±5,57	51,1±3,69	52,6±5,38
ROM, % de alcance del objetivo	3,7±1,03	3,7±1,24	3,3±0,93	4,3±1,61
AS, seg,	6,1±0,71	5,7±0,36	5,5±0,32	5,9±0,71
Rango de atención, seg,	41,9±2,09	42,4±2,81	41,3±2,18	39,6±2,26
FSA	14,5±1,64	14,5±1,79	15,3±1,55	15,9±1,58
Prueba de Stange	63,7±4,71	67,9±6,90	64,8±5,94	83,0±12,24



Prueba de Gench	44,7±2,52	47,1±3,30	43,7±2,71	47,8±3,78
-----------------	-----------	-----------	-----------	-----------

Así, el estudio usando un modelo experimental del mareo por movimiento demostró la eficacia de la composición de combinación de ULD anti-S100 + anti-eNOS y la preparación de un solo componente de ULD anti-S100. Los fármacos estudiados aumentaron la estabilidad de los sujetos ante el efecto cinético después de la simulación de los efectos clínicos y fisiológicos del mareo por movimiento que contribuyen a un proceso clínico más suave del mareo por movimiento y la recuperación más temprana de los sujetos después de la interrupción del tratamiento. Además, se demostró que el efecto contrario al mareo por movimiento de la composición de combinación (composiciones de ULD de anti-S100 + anti-eNOS) aumenta la eficacia de los componentes individuales. La eficacia de la composición de la combinación de ULD de anti-S100 + anti-eNOS en el control de las reacciones vestibulo-autonómicas y sensorial de un cuerpo en el mareo por movimiento experimental aumenta durante el transcurso de la ingesta. Cabe señalar que la ULD de anti-eNOS en forma de monopreparación no tiene un efecto protector contra el mareo por movimiento, pero cuando se combina con ULD de anti-S100 aumenta considerablemente el efecto contrario al mareo por movimiento del anterior, el cual se manifiesta por sí mismo en un día al igual que durante el transcurso de un tiempo corto de ingesta del fármaco. Con la composición de ULD de anti-S100 + anti-eNOS es con la que se observó la capacidad mejor para ajustar los procesos transitorios, es decir, para influir en la reactividad de las partes simpática y parasimpática del SNA así como las capacidades de adaptación del SNA en un estado de mareo por movimiento (para aumentar la tolerancia a los cambios repentinos en la posición del cuerpo), lo que es un componente importante de las propiedades para controlar el mareo por movimiento del fármaco. La composición de ULD de anti-S100 + anti-eNOS y la preparación de un solo componente de ULD de anti-S100, cuando se utilizan como preparación contra el mareo por movimiento, incluyendo en el momento de ejecución las funciones de un operador, son seguros y no tienen un impacto adverso sobre los parámetros físicos y psicofisiológicos.

La composición de combinación de ULD de anti-S100 + anti-eNOS y las ULD de anti-S100 pueden ser recomendadas para la profilaxis y el alivio de la quinesia en la enfermedad del movimiento (incluyendo mareos relacionados con el mar, el aire y el automóvil) a personas con un grado bajo y moderado de estabilidad. La composición de combinación tiene una alta seguridad y ningún efecto adverso en la calidad de la actividad profesional.

**Ejemplo 9.**

Para estudiar las propiedades de la composición farmacéutica de combinación de la presente solicitud para el tratamiento del síndrome psicoorgánico, se utilizaron comprimidos con un peso de 300 mg. Los comprimidos fueron impregnados con una composición farmacéutica que contenía soluciones acuosas-alcohólicas (6 mg/comprimido) de formas activadas potenciadas de anticuerpos policlonales de conejo purificados por afinidad contra la proteína específica del cerebro S-100 (anti-S100) y contra la NO sintasa endotelial (anti-eNOS) en dosis ultrabajas (ULD) obtenidas por superdilución de una solución inicial (con una concentración de 2,5 mg/ml) en 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup>, 100<sup>200</sup> veces, equivalente a la mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200 ("ULD anti-S100 + anti-eNOS").

Los pacientes del grupo control recibieron comprimidos de 300 mg impregnados con una composición farmacéutica que contenía soluciones acuosas-alcohólicas (6 mg/comprimido) de formas activadas potenciadas de anticuerpos policlonales de conejo purificados por afinidad contra la proteína específica del cerebro S-100 (anti-S100) en dosis ultrabajas (ULD) obtenidas por superdilución de una solución inicial (con una concentración de 2,5 mg/ml) en 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup>, 100<sup>200</sup> veces.

El estudio incluyó a pacientes con diagnóstico de síndrome psicoorgánico de origen postraumático. El síndrome psicoorgánico se caracteriza por la siguiente tríada de síntomas: debilidad de la memoria, bucles de inteligencia, incontinencia de los afectos (Tríada de Walther Buel).

El estudio clínico fue un estudio abierto aleatorio comparativo de grupos paralelos de eficacia y seguridad de la terapia en pacientes con síndrome psicoorgánico de origen post-traumático (el primer grupo de pacientes tomó la preparación de ULD de anti-S100, el segundo grupo de pacientes - la preparación de ULD anti-S100 + anti-eNOS).

El estudio incluyó a 6 pacientes de entre 35 y 90 años de edad (edad media de 70,83 ± 21,95) con diagnóstico de síndrome psicoorgánico.

Se verificó el cumplimiento de los pacientes de los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión:

1. Pacientes con diagnóstico de encefalopatía postraumática con síndrome psicoorgánico o con encefalopatía de etiología compleja (vascular, postraumática) con síndrome psicoorgánico, confirmado por la historia clínica, exámenes neurológicos y registros médicos.

2. Paciente sin cambio en la terapia concomitante durante al menos un mes antes de la Visita 1.
  3. No hay necesidad de un cambio en la terapia concomitante durante el período de observación completo.
  4. No hay necesidad de prescripción de fármacos inmunomoduladores durante los próximos 6 meses.
  5. Pacientes con un nivel de educación suficiente para comunicarse adecuadamente con el investigador y coordinador del estudio.
  6. Pacientes evaluados por el investigador como dignos de confianza y preparados para realizar todas las visitas clínicas programadas, pruebas y procedimientos estipulados en el protocolo.
  7. Pacientes con domicilio con una dirección válida.
- Criterios de exclusión:
- 10 1. Cualquier cirugía cerebral en su historia médica.
  2. Infarto agudo de miocardio.
  3. Accidente cerebrovascular hemorrágico.
  4. Diagnóstico de psicosis, trastorno bipolar o trastorno esquizoafectivo en su historia médica.
  - 15 5. Trastorno depresivo mayor según los criterios del módulo de la depresión de la mini-entrevista neuropsiquiátrica internacional (MINI).
  6. Factores / condiciones médicas o de otro carácter que, en opinión del investigador, pueden afectar a los resultados de las pruebas a los pacientes en estudio.
  - 20 7. Respuestas "2A", "2B", "2C" o "3" en la sección "I" del cuestionario de depresión de Beck (ideas suicidas activas con alguna intención de llevarlas a cabo, sin un plan específico, o ideas suicidas activas con un plan específico e intenciones al respecto).
  8. Enfermedad autoinmune en la historia médica.
  9. Daño agudo del hígado o cirrosis grave (clase C de Child-Pugh).
  10. Trastorno sin corregir de la función tiroidea.
  11. Hipertensión arterial descompensada en la historia médica.
  - 25 12. Enfermedad cardiovascular grave o descompensada, enfermedad hepática, enfermedad renal, enfermedades metabólicas, respiratorias o hematológicas, síntomas de enfermedad vascular periférica u otra condición médica o psiquiátrica que, en opinión del investigador, pueda afectar a la participación del paciente en el estudio o que pudiera dar lugar a una prolongada hospitalización o rehospitalización durante el estudio.
  13. Enfermedades y condiciones que a juicio del investigador puedan evitar que los pacientes participen en el estudio.
  - 30 14. La ingesta del fármaco que contiene ULD de anti-eNOS o del fármaco que contiene ULD de anti-S100 antes de su inclusión en el estudio.
  15. La ingesta de antidepresivos de cualquier grupo incluidas las preparaciones de plantas y homeopáticas.
  16. El consumo de ansiolíticos de cualquier grupo incluidas las preparaciones de plantas y homeopáticas.
  17. La ingesta de inmunomoduladores incluidas las preparaciones de plantas y homeopáticas.
  - 35 18. El tratamiento con esteroides sistémicos dentro del mes anterior a la Visita 0.
  19. La participación en el estudio del fármaco que contiene ULD de anti-eNOS o del fármaco que contiene ULD de anti-S100 si los pacientes tomaron al menos una dosis de preparación.
  20. La participación en otros estudios clínicos dentro del mes anterior a ser incluidos en este estudio.

21. El embarazo, la lactancia materna, la imposibilidad de utilizar un método anticonceptivo adecuado durante el período de estudio y dentro del mes posterior a la última ingesta del fármaco estudiado.
22. La presencia de alergia / intolerancia a cualquier componente de los fármacos incluida la intolerancia a la lactosa.
- 5 23. Pacientes que toman fármacos y neurolépticos, la dependencia del alcohol, enfermedades psiquiátricas en los pacientes.
24. Los pacientes son el personal del centro directamente relacionado con el estudio realizado y/o son miembros de la familia del personal investigador del centro que está directamente relacionado con el estudio en curso. Los "miembros de la familia" pueden ser un esposo (esposa), padres, hijos, hermanos (hermanas).
- 10 25. Participación en el proceso judicial o ser presumible que vaya a recibir una compensación o participar en el proceso judicial en la opinión de un investigador.
- Después de la determinación del paciente conforme a los criterios de inclusión y exclusión, los pacientes fueron distribuidos al azar en dos grupos de estudio: un grupo de pacientes tratados con ULD anti-S100 (3 pacientes, mujeres - 33,33%, hombres - 66,66%, edad media - 71,33 ± 16,25 años), un grupo de pacientes tratados con ULD anti-S100 + anti-eNOS (3 pacientes, mujeres 66,66% - hombres 33,33%, edad media - 70,33 ± 30,66 años).
- 15 25. Durante el estudio se realizaron las cinco visitas. La fase de tratamiento comprendió un promedio de 84 ± 5 días desde la visita 1 a la Visita 4. La visita 4 (Día 84 ± 5) fue el final del estudio seguido por una fase de seguimiento. La fase de seguimiento continuó desde la Visita 4 a la Visita 5 (Día 168 ± 5 en promedio).
- 20 Durante el análisis de la seguridad fueron incluidos los datos de todos los pacientes participantes en el estudio (n = 6). A lo largo del estudio, se registró una buena tolerancia al fármaco. No se registraron efectos adversos. Todos los pacientes de los grupos estudiados completaron el tratamiento según el protocolo, no hubo ningún caso de abandono temprano.
- 25 Además fueron evaluados el efecto de la preparación ULD anti-S100 + anti-eNOS en los principales signos clínicos y síntomas del síndrome psico-orgánico (inventario neuropsiquiátrico NPI, en intensidad), la intensidad de la angustia concomitante de la persona que asiste al paciente (Inventario Neuropsiquiátrico NPI, sección de socorro), así como las funciones cognitivas del paciente (Mini Examinación del Estado Mental, MMSE). Se encontró una mejora en los principales síntomas del síndrome psico-orgánico como fue la reducción estadísticamente significativa de la intensidad del inventario neuropsiquiátrico NPI (de 91,0 ± 15,13 a 69,0 ± 6,24, p <0,05), disminución de la angustia en el inventario neuropsiquiátrico NPI (de 44,33 ± 17,78 a 36,33 ± 3,21, p <0,05) en la visita 4 (Tabla 15).
- En el grupo de pacientes tratados solo con anti-S100 ULD no se registró una mejoría clínica.
- 30 En ese momento, la diferencia entre los grupos de pacientes en la puntuación total de la intensidad del inventario neuropsiquiátrico NPI al final del tratamiento fue estadísticamente significativa ap <0,05.

Tabla 15

	NPI (intensidad)	NPI (angustia)	ADS-ADL	MMSE
ULD anti-S100+anti-eNOS antes del tratamiento	91,0±15,13	44,33±17,78	42,66±4,93	22,33±3,21
ULD anti-S100+anti-eNOS después del tratamiento	69,0±6,244*#	36,33±3,21*	52,0±5,57	22,66±2,08
ULD anti-S100 antes del tratamiento	114,0±25,53	45,66±14,47	33,0±13,89	22,33±4,16
ULD anti-S100 después del tratamiento	99,66±18,0	49,0±17,05	31,66±10,69	23,0±4,36

\* - p desde el inicio <0,05; # - p desde control <0,05

Por lo tanto, en el estudio clínico llevado a cabo se vio un efecto positivo de la combinación de ULD anti-S100 + anti-eNOS en los principales signos clínicos y síntomas del síndrome psico-orgánico y una tendencia positiva de las funciones cognitivas en el síndrome psico-orgánico. Además, se confirmó una buena tolerancia al fármaco. No se dieron casos de efectos adversos relacionados con el fármaco.

**5 Ejemplo 10.**

10 Para estudiar las propiedades de la composición farmacéutica de combinación de la presente solicitud para el tratamiento del Alzheimer, se utilizaron comprimidos con un peso de 300 mg. Los comprimidos fueron impregnados con una composición farmacéutica que contenía soluciones acuosas-alcohólicas (6 mg/comprimido) de formas activadas potenciadas de anticuerpos policlonales de conejo purificados por afinidad contra la proteína específica del cerebro S-100 (anti-S100) y contra la NO sintasa endotelial (anti-eNOS) en dosis ultrabajas (ULD) obtenidas por superdilución de una solución inicial (con una concentración de 2,5 mg/ml) en 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup>, 100<sup>200</sup> veces, equivalente a la mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200 ("ULD anti-S100 + anti-eNOS").

15 Los pacientes del grupo control recibieron comprimidos de 300 mg impregnados con una composición farmacéutica que contenía soluciones acuosas-alcohólicas (6 mg/comprimido) de formas activadas potenciadas de anticuerpos policlonales de conejo purificados por afinidad contra la proteína específica del cerebro S-100 (anti-S100) en dosis ultrabajas (ULD) obtenidas por superdilución de una solución inicial (con una concentración de 2,5 mg/ml) en 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup>, 100<sup>200</sup> veces. El estudio incluyó a pacientes diagnosticados con Alzheimer. El Alzheimer se caracteriza por la demencia (demencia adquirida, deterioro de la actividad cognitiva estable con cierta pérdida de conocimientos previamente adquiridos y habilidades prácticas, dificultades o imposibilidad de adquirir nuevos conocimientos).

20 El estudio fue un ensayo clínico abierto aleatorio comparativo de eficacia y seguridad de la terapia en dos grupos paralelos (preparaciones de ULD anti-S100 y ULD anti-S100 + anti-eNOS) en el tratamiento de pacientes con Alzheimer leve o moderado.

El estudio incluyó a 6 pacientes de 55 - 64 años (edad media de 59,0 ± 3,58) diagnosticados con Alzheimer de leve a moderado.

25 Se verificó el cumplimiento de los pacientes de los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión:

1. Los pacientes diagnosticados de Alzheimer de leve a moderado, confirmado por el historial clínico, exámenes neurológicos y registros médicos.
2. Paciente sin cambio en la terapia concomitante durante al menos un mes antes de la visita 1.
- 30 3. No hay necesidad de un cambio en la terapia concomitante para el período de observación completo.
4. No hay necesidad de prescripción de fármacos inmunomoduladores durante los próximos 6 meses.
5. Pacientes con un nivel de educación suficiente para comunicarse adecuadamente con el investigador y coordinador del estudio.
6. Pacientes evaluados por el investigador como dignos de confianza y preparados para realizar todas las visitas clínicas programadas, pruebas y procedimientos estipulados en el protocolo.
- 35 7. Los pacientes con domicilio con una dirección válida.

Los criterios de exclusión son los siguientes:

1. Cualquier cirugía cerebral en su historia médica.
2. Infarto agudo de miocardio.
- 40 3. Accidente cerebrovascular hemorrágico.
4. Diagnóstico de psicosis, trastorno bipolar o trastorno esquizoafectivo en la historia médica.
5. Trastorno depresivo según los criterios del módulo de la depresión de la mini-entrevista neuropsiquiátrica internacional (MINI).

6. Factores / condiciones médicas o de otro carácter que, en opinión del investigador pueden afectar a los resultados de las pruebas a los pacientes en estudio.
7. Respuestas "2A", "2B", "2C" o "3" en la sección "I" del cuestionario de depresión Beck (ideas suicidas activas con alguna intención de llevarlas a cabo sin un plan específico, o ideas suicidas activas con un plan específico e intenciones al respecto).
8. Enfermedad autoinmune en la historia médica.
9. Daño agudo del hígado o cirrosis grave (clase C de Child-Pugh).
10. Trastorno sin corregir de la función tiroidea.
11. Hipertensión arterial descompensada en la historia médica.
12. Enfermedad cardiovascular grave o descompensada, enfermedad hepática, enfermedad renal, enfermedades metabólicas, respiratorias o hematológicas, síntomas de enfermedad vascular periférica u otra condición médica o psiquiátrica que, en opinión del investigador, pueda afectar a la participación del paciente en el estudio o que pudiera dar lugar a una prolongada hospitalización o rehospitalización durante el estudio.
13. Enfermedades y condiciones que a juicio del investigador puedan evitar que los pacientes participen en el estudio.
14. La ingesta del fármaco que contiene ULD de anti-eNOS o del fármaco que contiene ULD de anti-S100 antes de su inclusión en el estudio.
15. La ingesta de antidepresivos de cualquier grupo incluidas las preparaciones de plantas y homeopáticas.
16. El consumo de ansiolíticos de cualquier grupo incluidas las preparaciones de plantas y homeopáticas.
17. La ingesta de inmunomoduladores incluidos las preparaciones de plantas y homeopáticas.
18. El tratamiento con esteroides sistémicos dentro del mes anterior a la visita 0.
19. La participación en el estudio del fármaco que contiene ULD de anti-eNOS o del fármaco que contiene ULD de anti-S100 si los pacientes tomaron al menos una dosis de preparación.
20. La participación en el estudio del fármaco que contiene ULD de anti-eNOS o del fármaco que contiene ULD de anti-S100 si los pacientes tomaron al menos una dosis de preparación.
21. El embarazo, la lactancia materna, la imposibilidad de utilizar un método anticonceptivo adecuado durante el período de estudio y dentro del mes posterior a la última ingesta del fármaco estudiado.
22. La presencia de alergia / intolerancia a cualquier componente de los fármacos incluida la intolerancia a la lactosa.
23. Pacientes que toman drogas y neurolépticos, la dependencia alcohólica, enfermedad psiquiátrica en los pacientes.
24. Los pacientes son el personal del centro directamente relacionado con el estudio realizado y/o son miembros de la familia del personal investigador del centro que está directamente relacionado con el estudio en curso. Los "miembros de la familia" pueden ser un esposo (esposa), padres, hijos, hermanos (hermanas).
25. Participación en el proceso judicial o ser presumible que vaya a recibir una compensación o participar en el proceso judicial en la opinión de un investigador. Después de la determinación del paciente conforme a los criterios de inclusión y exclusión, los pacientes fueron distribuidos al azar en dos grupos de estudio: un grupo de pacientes tratados con ULD anti-S100 (3 pacientes, mujeres - 100%, hombres - 0%, edad media - 59,0 ± 3,6 años), un grupo de pacientes tratados con ULD anti-S100 + anti-eNOS (3 pacientes, mujeres 66,66% - hombres 33,33%, edad media - 59.0 ± 4.36 años).
- Durante el estudio se realizaron las cinco visitas. La fase de tratamiento comprendió un promedio de 84 ± 5 días desde la visita 1 a la Visita 4. La visita 4 (Día 84 ± 5) fue el final del estudio seguido por una fase de seguimiento. La fase de seguimiento continuó desde la Visita 4 a la Visita 5 (Día 168 ± 5 en promedio). Durante el análisis de la seguridad fueron incluidos los datos de todos los pacientes participantes en el estudio (n = 6). A lo largo del estudio, se registró una buena tolerancia al fármaco. No se registraron efectos adversos. Todos los pacientes de los grupos estudiados completaron el tratamiento según el protocolo, no hubo ningún caso de abandono temprano.

Además fueron evaluados el efecto de la preparación ULD anti-S100 + anti-eNOS en los principales signos clínicos y síntomas del Alzheimer (inventario neuropsiquiátrico NPI, en intensidad), la intensidad de la angustia concomitante de la

5 persona que asiste al paciente (Inventario Neuropsiquiátrico NPI, sección de socorro), así como las funciones cognitivas del paciente (Mini Examinación del Estado Mental, MMSE). Se encontró una mejora en los principales síntomas del Alzheimer, como fue la reducción estadísticamente significativa de la intensidad del inventario neuropsiquiátrico NPI (de  $91,0 \pm 15,13$  a  $69,0 \pm 6,24$ ,  $p < 0,05$ ), disminución de la angustia en el inventario neuropsiquiátrico NPI (de  $24,33 \pm 4,73$  a  $12,0 \pm 3,46$ ,  $p < 0,05$ ) en la visita 4 (Tabla 16).

También se encontró una tendencia a la baja en la angustia de la persona que asiste al paciente, así como una reducción de la actividad de la vida cotidiana del paciente al final del tratamiento (sin ser estadísticamente significativa, posiblemente debido al pequeño número de pacientes incluidos en el estudio).

10 Por otra parte, se observó una tendencia a la mejora de las funciones cognitivas, reflejada en el aumento de la puntuación MMSE de  $23,66 \pm 3,21$  hasta  $26,66 \pm 1,53$  puntos. Sin embargo, la diferencia tampoco alcanza valores estadísticamente significativos al final de la terapia, seguramente relacionada con el tamaño reducido de la muestra.

Los mismos pacientes en el grupo tratado con ULD anti-S100, no mostraron ninguna tendencia a la mejoría, a excepción de una mejora estadísticamente no significativa de la puntuación MMSE de  $22,66 \pm 0,58$  hasta  $23,33 \pm 0,58$  puntos.

15 En ese momento, la diferencia entre los grupos de pacientes en la puntuación MMSE total al final del tratamiento fue estadísticamente significativa en  $p < 0,05$ .

Tabla 16

	NPI (intensidad)	NPI (angustia)	ADCS-ADL	MMSE
ULD anti-S100+anti-eNOS antes del tratamiento	24.33±4.73	9.66±1.53	71.0±6.56	23.66±3.21
ULD anti-S100+anti-eNOS después del tratamiento	12.0±3.46 *	5.0±3.61	74.33±2.51	26.66±1.53#
ULD anti-S100 antes del tratamiento	35.66±5.50	22.33±5.50	61.66±5.13	22.66±0.58
ULD anti-S100 después del tratamiento	38.33±8.5	23.0±5.0	61.33±5.86	23.33±0.58

\* - p desde el inicio  $< 0,05$ ; # - p desde control  $< 0,05$

20 Por lo tanto, en el estudio clínico llevado a cabo se vio un efecto positivo de la combinación de ULD anti-S100 + anti-eNOS en los principales signos clínicos y síntomas del Alzheimer y una tendencia positiva de las funciones cognitivas en la enfermedad. Además, se confirmó una buena tolerancia al fármaco. No se dieron casos de efectos adversos relacionados con el fármaco.

**Ejemplo 11.**

25 Grupo 1 - el grupo tratado con el fármaco activo recibió comprimidos de 300 mg impregnados con una solución acuosa-alcohólica (3 mg/comprimido) de una forma activada potenciada de anticuerpos policlonales de conejo contra proteínas específicas del cerebro S-100 y NO cintaza endotelial, purificado sobre el antígeno, a dosis ultrabaja (ULD de anti-S100 + ULD anti-eNOS) obtenido por superdilución de la solución inicial (con una concentración de 2,5 mg/ml)  $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{200}$  veces, equivalente a la mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200;

30 Grupo 2 - el grupo de comparación recibió comprimidos de 300 mg impregnados con una composición farmacéutica que contenía soluciones acuosas-alcohólicas (3 mg/comprimido) de una forma activada potenciada de anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína específica del cerebro S-100 (anti S-100) a dosis ultrabaja (ULD), obtenida por superdilución de la solución inicial de  $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{200}$  veces, equivalente a la mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C50.

Grupo 3 – el grupo control (placebo) recibió comprimidos que contienen excipientes (lactosa monohidrato - 267 mg, celulosa microcristalina - 30 mg, estearato de magnesio - 3 mg).

35 La eficacia del fármaco activo ULD anti-S100 + anti-eNOS en el tratamiento de pacientes con síndrome de déficit de atención e hiperactividad (TDAH) se llevó a cabo en el comparativo de placebo doble ciego controlado en 146 niños de 6 a 12 años de edad (edad media de  $9,3 \pm 0,24$  años) que fueron clasificados al azar en tres grupos en función del tratamiento. Lo largo de las siguientes 12 semanas, los pacientes del grupo N ° 1 (n = 46) recibieron la composición ULD

- anti-S100 + anti-eNOS, 2 comprimidos dos veces al día; los miembros del grupo de comparación (n = 50) recibieron ULD anti-S100, 2 comprimidos dos veces al día; los miembros del grupo de control (n = 50) recibieron 2 comprimidos dos veces al día. Todos los pacientes incluidos en el estudio habían sido diagnosticados clínicamente para este trastorno, confirmado mediante elevados niveles en la escala de evaluación de los síntomas del TDAH (ADHDRS-IV-Versión para el Hogar): 33,8 ± 0,92 en el grupo 1; 32,5 ± 1,14 en el grupo 2 y 33,6 ± 0,91 en el grupo 3. La mayor parte de los niños padecían un grado moderado del TDAH según el cuestionario de gravedad CGI-ADHD. La puntuación total del cuestionario fue de 4,0 ± 0,02 puntos en el grupo 1, 4,0 ± 0,03 puntos en el grupo 2, y 4,0 ± 0,00 puntos en el grupo 3. Por lo tanto, en un principio los pacientes de los tres grupos tenían indicadores comparables de la severidad del TDAH. De acuerdo con los resultados de los exámenes neurológicos, clínicos, exámenes de laboratorio e instrumentales en el momento del estudio no se detectaron anomalías en ningún paciente. Durante las 12 semanas de tratamiento, los pacientes fueron evaluados en seis ocasiones por un médico. Durante las cuales el médico-investigador registró la evolución de la intensidad de las manifestaciones clínicas del TDAH (puntuación total en una escala ADHDRS-IV-Versión para el Hogar) y la gravedad de la enfermedad (mediante la prueba de gravedad CGI-ADHD), además de supervisar las recetas médicas y la administración del tratamiento evaluando la seguridad del tratamiento.
- El análisis de la eficacia de 12 semanas de tratamiento en los tres grupos mostró una disminución de más del 25% de la puntuación total inicial en la escala ADHDRS-IV-Versión para el Hogar en el 75% (n = 36) de los niños tratados con la composición ULD anti-S100 + anti-eNOS; en el 66% (n = 33) de los pacientes tratados con ULD anti-S100 y en el 56% (n = 28) de los niños que recibieron placebo. Las diferencias de eficacia entre los grupos, teniendo en cuenta la clasificación en tres niveles de en función de la mejora de la condición (reducción de la puntuación total en una escala ADHDRS-IV en <25%, 25-49,9% o ≥ 50% desde el punto de partida), se muestran detalladas en la Tabla 17. En el 52% de los niños del grupo 9 que fueron tratados con ULD anti-S100 + anti-eNOS se observó una mejora significativa, con una reducción en la puntuación total del 50% o más desde el punto de partida, y en el 34% de los niños del grupo 2, que fueron tratados con ULD anti-S100 (frente al 8% de los pacientes en el grupo 3 con placebo).
- En los tres grupos de observación se produjo una reducción significativa (p <0,001) de las implicaciones clínicas del TDAH en comparación con el estado inicial después de 2 semanas de tratamiento. En los pacientes de los grupos 9 y 2 se observó una dinámica positiva más significativa ya que se identificaron diferencias significativas en las puntuaciones totales en el ADHDRS-IV-Versión para el Hogar, no sólo en relación con las pruebas durante las visitas, si no también en comparación con los índices del grupo 3 tratado con placebo. En las semanas siguientes de tratamiento, la eficacia de los tratamientos con la composición ULD anti-S100 + anti-eNOS y la preparación de un solo componente de ULD-S100 comenzó a crecer, de manera más significativa en el grupo con el fármaco activo (p <0,05). La disminución resultante en la puntuación total en una escala ADHDRS-IV-Versión para el Hogar de niños del grupo 9 tratados con ULD anti-S100 + anti-eNOS fue de 16,5 puntos, en los pacientes del grupo 2 tratados con ULD anti-S100 - 12,4 puntos (en comparación con los 6,3 puntos en el grupo 3 con placebo). Como resultado de las 12 semanas de tratamiento, la intensidad de las implicaciones clínicas del TDAH en niños tratados con la composición ULD anti-S100 + anti-eNOS disminuyó casi a la mitad (-48,8%) y en pacientes tratados con ULD anti-S100 disminuyó en más de un tercio (-38,2%) desde el punto de partida.
- La ingesta de la composición de ULD anti-S100 + anti-eNOS o ULD anti-S100 influyó en los dos conjuntos de síntomas de este trastorno, que fue confirmado mediante las evaluaciones de dos tramos de la escala de la prueba ADHDRS-IV-Versión para el Hogar. Además, los resultados del tratamiento con la composición ULD anti-S100 + anti-eNOS fueron significativamente más relevantes que la eficacia de la terapia con la preparación de un solo componente ULD anti-S100 en la intensidad de las implicaciones y el déficit de atención e hiperactividad / impulsividad.
- El efecto terapéutico positivo del fármaco activo ULD anti-S100 + anti-eNOS y el fármaco de comparación ULD-S100 se ha demostrado mediante la evaluación de los resultados del tratamiento de los pacientes en una escala de evaluación ADHD (Gravedad de CGI-ADHR) (Tabla 17). La gravedad de la enfermedad se redujo de moderado a leve en casi la cuarta parte de los pacientes en el grupo ULD anti-S100 + anti-eNOS, e incluso a un mínimo tal y como lo demuestra una disminución en el valor medio en una escala de gravedad de CGI-ADHR del 15% después de 3 meses de tratamiento (de 4,0 ± 0,02 a 3,4 ± 0,06, p <0,001). El efecto de la terapia con una preparación de un solo componente ULD anti-S100 fue ligeramente inferior situándose en el 10% en una escala de gravedad CGI-ADHR-pasados 3 meses (frente al 5% en el grupo placebo). El análisis de la seguridad incluyó datos de todos los pacientes participantes en el estudio. Durante todo el período de seguimiento se comparó con el placebo, la tolerancia del fármaco activo ULD anti-S100 + anti-eNOS y la preparación ULD-S100. Se informó sobre eventos adversos en un paciente del grupo con ULD anti-S100 (dolores de cabeza que desaparecieron durante la cuarta semana del estudio) y en un paciente del grupo placebo (sonambulismo durante el segundo mes de observación). Estos eventos adversos no estaban relacionados con la terapia. Además, durante el tratamiento de los casos individuales de enfermedad respiratoria aguda se observó que tampoco están asociados con la terapia. Todos los pacientes de los grupos estudiados completaron el tratamiento en el horario previsto por el protocolo del estudio; no hubo abandonos tempranos del programa. La ausencia de cambios patológicos de acuerdo al examen físico de los pacientes y durante el transcurso de los análisis sucesivos de los parámetros de laboratorio han confirmado la seguridad de la terapia de estudio.

De acuerdo con los resultados del examen físico (frecuencia cardíaca, PAS, PAD, la temperatura del cuerpo) no se registraron alteraciones patológicas durante el tratamiento en los pacientes. Las diferencias en el análisis de los parámetros de acuerdo a las visitas y en los grupos comparados no alcanzó una relevancia estadística significativa y no excede los límites de las desviaciones fisiológicamente aceptables. Las altas tasas de fidelidad a la terapia, además, evidencian la eficacia de la seguridad de las preparaciones estudiadas. Al final del tercer mes de tratamiento, la fidelidad fue del  $99,8 \pm 1,15\%$  y  $98,8 \pm 2,25\%$  en el grupo 9 tratados con ULD anti-S100 + anti-eNOS y en el grupo 2 tratados con ULD anti-S100 respectivamente (frente a  $74,6 \pm 2,54\%$  en el grupo 3 con placebo).

Por lo tanto, el estudio demostró la eficacia y seguridad de las composición ULD anti-S100 + anti-eNOS y de una preparación de un solo componente ULD-S100 en el tratamiento de niños con TDAH. El efecto terapéutico más pronunciado en el transcurso de 12 semanas se observó en los medicamentos complejos (ULD anti-S100 + anti-eNOS), manifestándose en una mejora de los síntomas clínicos en la mayoría (75%) de los niños. La composición ULD anti-S100 + anti-eNOS fue capaz de corregir los dos grupos de síntomas del TDAH y, en consecuencia, se observó una reducción significativa de los trastornos de atención e hiperactividad en pacientes con TDAH.

Tabla 17.

15 **Dinámica de la puntuación total de la escala ADHDRS-IV- Versión para el hogar, después de 12 semanas de tratamiento**

Grupos de pacientes	La proporción de pacientes con disminución de la puntuación total de la escala ADHDRS-IV-Versión para el Hogar		
	Menos del 25.0% desde el punto de partida	entre 25.0 – 49.9% desde el punto de partida	entre 50.0% y más sobre el punto de partida
<b>ULD anti-S100 + anti-eNOS, n=48</b>	12 (25%)	11 (23%)	25 (52%) <sup>##</sup>
<b>ULD anti - S100, n=50</b>	17 (34%)	16 (32%)	17 (34%) <sup>##</sup>
<b>Placebo, n=50</b>	22 (44%)	24 (48%)	4 (8%)

La diferencia es significativa en comparación con el grupo placebo:

<sup>##</sup> P <0,01.

Tabla 18.

20 **Dinámica de la evidencia de las implicaciones clínicas del TDAH en la escala ADHDRS-IV-Versión para el Hogar**

Etapa del tratamiento	ULD anti-S100 + anti-eNOS, n=48		ULD anti-S100, n=50		Placebo, n=50	
	Valor (M±SE)	Δ desde el punto de partida	Valor (M±SE)	Δ desde el punto de partida	Valor (M±SE)	Δ desde el punto de partida
<b>Puntuación Total</b>						
Proyección	33.8 ±0.96		32.5 ± 1.14		33.6 ± 0.91	
2 semanas	24.1 ±0.97 <sup>*** #</sup>	-28.7%	25.1 ± 1.03 <sup>*** #</sup>	-22.8 %	28.8 ± 1.26 <sup>***</sup>	-14.3 %
4 semanas	22.6 ±0.98 <sup>*** ##</sup>	-33.1%	22.7 ± 1.23	-30.2 %	29.9 ± 1.06	-11.0 %



			*** ##		***	
6 semanas	19.4 ±0.95 *** ##	-42.6%	20.8 ± 1.06 *** ##	-36.0 %	29.0 ± 1.25 ***	-13.7 %
8 semanas	18.9 ±0.94 *** # ##	-44.1%	20.9 ± 1.30 *** ###	-35.7 %	27.6 ± 1.35 ***	-17.9 %
12 semanas	17.3 ±0.96 *** # ## &	-48.8%	20.1 ± 1.21 *** ###	-38.2 %	27.3 ± 1.48 ***	-18.8 %
<b>Desórdenes de Atención</b>						
Proyección	18.4 ±0.55		17.4 ± 0.57		18.4 ± 0.43	
2 semanas	12.8 ±0.57 *** #	-30.4%	13.7 ± 0.68 *** #	-21.3 %	16.1 ± 0.66 ***	-12.5 %
4 semanas	11.6 ±0.56 *** # ##	-37.0%	12.9 ± 0.79 *** ###	-25.9 %	16.4 ± 0.57 ***	-10.9 %
6 semanas	10.7 ±0.54 *** ###	-41.8%	11.9 ± 0.64 *** ###	-31.6 %	16.0 ± 0.70 ***	-13.0 %
8 semanas	10.3 ±0.53 *** ###	-44.0%	11.5 ± 0.70 *** ###	-33.9 %	15.1 ± 0.76 ***	-17.9 %
12 semanas	9.7 ±0.55 *** # # &	-47.3%	11.4 ± 0.68 *** ##	-34.5 %	14.9 ± 0.78 ***	-19.0 %
<b>Hiperactividad / impulsión</b>						
Proyección	15.4 ±0.61		15.1 ± 0.77		15.2 ± 0.62	
2 semanas	11.3 ±0.63 ***	-26.6%	11.4 ± 0.61 ***	-24.5 %	12.7 ± 0.74	-16.4 %

					***	
4 semanas	11.0 ±0.62 *** ###	-28.6%	9.8 ± 0.64 *** ###	-35.1 %	13.5 ± 0.67 **	-11.2 %
6 semanas	8.7 ±0.59 *** ##	-43.5%	8.9 ± 0.64 *** ###	-41.1 %	12.9 ± 0.73 **	-15.1 %
8 semanas	8.6 ±0.60 *** ##	-44.2%	9.5 ± 0.76 *** ##	-37.1 %	12.5 ± 0.81 ***	-17.8 %
12 semanas	7.6 ±0.57 *** ### &	-50.6%	8.7 ± 0.70 *** ###	-42.4 %	12.5 ± 0.82 ***	-17.8 %

Nota: La diferencia es significativa en comparación con el parámetro de referencia:

\* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001.

La diferencia es significativa en comparación con el grupo placebo:

5 # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0,001.

La diferencia es significativa en comparación con el grupo de ULD anti-S100:

& p <0,05.

Tabla 19.

**La dinámica de nivel de gravedad en la escala de TDAH**

Severidad CGI-ADHD

10

Parámetro		
	Severidad ADHD	
	M±SE	Δ desde el punto de partida
<b>ULD anti-S100 + anti-eNOS, n=48</b>		
Proyección	4,0±0,02	
4 semanas	3,6±0,02**	-10%
12 semanas	3,4±0,06***	-15%
<b>ULD anti-S100, n=50</b>		
Proyección	4,0±0,03	
4 semanas	3,8±0,06**	-5%

12 semanas	3,6±0,08***	-10%
<b>Placebo, n=50</b>		
Proyección	4,0±0,01	
4 semanas	3,9±0,05	-2,5%
12 semanas	3,8±0,06***	-2,5%

La diferencia es significativa en comparación con el parámetro de referencia:

\*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001.

**Ejemplo 12.**

5 Un estudio clínico a doble ciego, controlado con placebo, de una combinación de forma activada potenciada del anticuerpo contra el fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II, en una mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200, con la forma activada potenciada del anticuerpo contra la NO sintasa endotelial, en una mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200, en pacientes humanos con insuficiencia cardíaca crónica para evaluar los principales parámetros de la patología CHF.

10 80 pacientes (ICC II-IV de la clase funcional (CF), la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) inferior al 40%) fueron divididos en 4 grupos en igualdad de trato y control para un estudio de 6 meses. El tratamiento de base no se interrumpió (bisoprolol β-bloqueantes, inhibidores de la ECA enalapril, aspirina (a menos que esté contraindicado), la administración de diuréticos, nitratos, digoxina también fue admitido). El grupo 1 recibió la forma activada potenciada del anticuerpo frente a un fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II (mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200) (3 comprimidos / día, n = 20). El grupo 2 recibió la forma activada potenciada del anticuerpo frente a la NO sintasa endotelial (mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200) (3 comprimidos / día, n = 20). El grupo 3 recibió la composición de combinación farmacéutica que comprende tanto la forma activada potenciada del anticuerpo frente a un fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II (mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200) y la forma activada potenciada del anticuerpo frente a NO sintasa endotelial (mezcla de las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200) (3 comprimidos / día, n = 20). El Grupo 4 recibió placebo (3 comprimidos / día, n = 20). Los grupos fueron comparables en los parámetros del estudio inicial: según edad y sexo, y la gravedad (la clase de la ICC y FEVI) y la duración de la enfermedad.

25 Antes y después del tratamiento, se evaluó el remodelado vascular y la disfunción endotelial en los pacientes por el efecto de los medicamentos administrados, al ser importantes para el proceso de CHF y la progresión. Los efectos de los medicamentos en los procesos de remodelado vascular fueron evaluados mediante la velocidad de la onda del pulso (VOP) ("Sistema Colson") en la carótida-femoral (CF) (arteria elástica) y carótida-radial (CR) (arteria muscular) de los segmentos de las arterias.

La tabla 20 muestra la dinámica de las tasas de velocidad de la onda del pulso en la carótida-femoral (CF) (arteria elástica) y carótida-radial (CR) (arteria muscular) de los segmentos de las arterias.

Tabla 20.

Grupos / Parámetros	ULDs <sup>1</sup> of Abs <sup>2</sup> al fragmento C-terminal del receptor AT1 de angiotensina II			ULD de Abs a NO sintasa endotelial			Combinación de ULD de Abs al fragmento C-terminal de receptores AT1 de la angiotensina II y ULD of Abs de NO sintasa endotelial			Placebo		
	^	&	Δ%	^	&	Δ%	^	&	Δ%	^	&	Δ%
CF, m/c	9,7±0,5	8±0,6	-14,8*	10,1±0,5	9,8±0,4	-2,97	10,8±0,3	8,6±0,6	-20,3*	8,2±0,4	8,2±0,5	0,1
CR, m/c	8,6±0,2	8,9±0,3	2,9	8,8±0,1	8,3±0,3	-5,7	8,9±0,5	7,6±0,7	-15,6*# \$	9,1±0,3	9,7±0,3	6,4*

(^)Indica el valor inicial

(&)Indica seis meses después del inicio de la administración

(\*) Indica la diferencia de valor inicial es verificable con un valor de  $p < 0,05$ .

5 (#)Indica diferencia con el grupo que recibió ULD de Abs a fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II, con diferencia verificable en el valor de  $p < 0,05$ .

(\$)Indica diferencia con el grupo que recibió ULD de Abs a NO sintasa endotelial con la diferencia verificable en el valor de  $p < 0,05$ .

(1) ULD indica dosis ultrabajas.

(2) Abs indica anticuerpos.

10 Después de 6 meses de tratamiento, sólo el grupo 3 mostró un efecto comprobado de la composición farmacéutica reivindicada en la rigidez de las arterias musculares. El grupo 1 que recibió una dosis ultrabaja del anticuerpo frente a un fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II, y el grupo 3 que recibió la combinación de la composición farmacéutica de la invención mostraron un aumento demostrado en la rigidez de las arterias elásticas.

### Ejemplo 13.

15 Un estudio clínico a doble ciego y controlado con placebo de una combinación de forma activada potenciada del anticuerpo contra el fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II, en una mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200, con la forma activada potenciada del anticuerpo contra la NO sintasa endotelial, en una mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200, en pacientes humanos con insuficiencia cardíaca crónica para evaluar la medida clave de la calidad de vida.

20 80 pacientes (ICC II-IV de la clase funcional (CF), la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) inferior al 40%) fueron divididos en 4 grupos en igualdad de trato y control para un estudio de 6 meses. El tratamiento de base no se interrumpió (bisoprolol  $\beta$ -bloqueantes, inhibidores de la ECA enalapril, aspirina (a menos que esté contraindicado), la administración de diuréticos, nitratos, digoxina también fue admitido). El grupo 1 recibió la forma activada potenciada del anticuerpo frente a un fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II (mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200) (3 comprimidos / día,  $n = 20$ ). El grupo 2 recibió la forma activada potenciada del anticuerpo frente a la NO sintasa endotelial (mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200) (3 comprimidos / día,  $n = 20$ ). El grupo 3 recibió la composición de combinación farmacéutica que comprende tanto la forma activada potenciada del anticuerpo frente a un fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II (mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200) y la forma activada potenciada del anticuerpo frente a la NO sintasa endotelial (mezcla de las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200) (3 comprimidos / día,  $n = 20$ ). El Grupo 4 recibió placebo (3 comprimidos / día,  $n = 20$ ). Los grupos fueron comparables en los parámetros del estudio inicial: edad y sexo, y la gravedad (la clase de la ICC y FEVI) y la duración de la enfermedad. Antes y después del tratamiento, los pacientes fueron evaluados para la calidad de vida (cuestionarios de Minnesota y Kansas), los parámetros morfológicos del corazón, y la tolerancia al ejercicio físico.

35 La tabla 3 muestra los resultados del estudio de forma dinámica de los parámetros básicos de la eficacia del tratamiento.

Después de 6 meses de tratamiento, los pacientes del grupo 1 tratados con dosis ultrabaja de anticuerpos frente a un fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II mostraron una mejoría significativa de la calidad de vida, la mejora de la función sistólica del ventrículo izquierdo, y una mayor tolerancia al ejercicio físico. El grupo 2 mostró una disminución comprobada en la ansiedad y los niveles de depresión y en calidad de vida, que fueron evaluados mediante el cuestionario de Kansas. El estudio confirmó que el efecto terapéutico máximo se alcanzó mediante la combinación de la composición farmacéutica de la invención con la terapia estándar de la ICC, que se administró a los pacientes del grupo 3 que mostrando una dinámica positiva comprobada en todos los parámetros en estudio.

45 La combinación de la forma activa potenciada del anticuerpo contra un fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II y del anticuerpo con la sintasa endotelial de óxido nítrico (NO-sintasa) en la composición farmacéutica de la invención (combinación de fármacos) proporciona un inesperado efecto terapéutico sinérgico, lo que implica una mayor influencia sobre el remodelado vascular y la disfunción endotelial que es fundamental para el proceso de CHF y la progresión, así como en la mejora de la calidad de vida de los pacientes, en los parámetros morfológicos del corazón y la tolerancia al ejercicio físico, lo cual queda confirmado por los ensayos clínicos .

Los resultados se exponen en la Tabla 21.

Tabla 21.

Grupos / Parámetros	ULD <sup>1</sup> de ABS <sup>2</sup> al fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II			ULD de Abs a endotelial NO sintasa			Combinación de ULD de Abs a C-terminal del fragmento de receptor AT1 de la angiotensina II y ULD de Abs a NO sintasa endotelial			Placebo		
	^	&	Δ%	^	&	Δ%	^	&	Δ%	^	&	Δ%
Minnesota <sup>3</sup>	47.5 ± 2.8	39.1 ±3.8 **	- 17.6	48.1 ± 3.7	40.8 ± 3.8	-15.2	43. 9± 2.8	32.0± 4.9 ***\$	- 27.1	48.3± 3.7	42.4± 2.9 **	- 12.2
Kansas <sup>4</sup>	82.1 ± 2.3	70.1 ±5.5 ***	- 14.6	81.5 ±2.5	72.0 ±8.2 *	- 11.7	87, 7± 2.3	65.7±7. 3 ***\$	- 25.1	83.8± 3.5	60.3± 6.8	- 7.2
HADS <sup>5</sup>	15.3 ± 1.0	12.5 ±0.9 **	- 18.5	16.2 ±1.7	11.3 4±2. 1 ***	-30.3	16. 2± 1.3	8.4±0.9 *** # \$\$	- 48.1	17.3± 1.1	15.9± 1.1	- 8.1
FC CHF <sup>6</sup>	2.7± 0.1	2.2± 0.1** *	- 17.3	2.9± 0.1	2.7± 0.2	- 7.3	3.0 ± 0.2	1.9±0.1 *** # \$	- 36.6	2.7± 0.1	2.5±0. 1	- 6.2

FF LV'	27.1 ± 0.9	33.6 ±1.5 **	24.0	28.2 ±1.5	25.3 ±1.7	10.3	25.3 ±1.1	34.6±1.9 *** # \$	36.7	26.4±1.1	28.0±1.4	6.3
Prueba física: 6 minutos caminando.	378.7±12.4	419.6±13.7***	10.8	383.1±15.3	416.8±17.2	8.8	378.7±12.4	450.1±17.7** # \$	18.9	390.5±11.9	409.1±11.5	4.8

\*, \*\*, \*\*\* - Los valores de p <0,05, 0,01 y 0,001, respectivamente

# - Diferencia entre el grupo que recibió ULD de Abs contra el fragmento C-terminal del receptor AT1 de la angiotensina II verificable con un valor de p <0,05

5 \$, \$ \$ - Diferencia con el grupo que recibió ULD de Abs contra la NO sintasa endotelial es verificable en los valores de p de 0,05 y 0,01, respectivamente.

(1)-ULD medios de dosis ultrabajas

(2) Abs significa anticuerpos

(3) "Minnesota" se refiere al Cuestionario de Minnesota

(4) "Kansas" se refiere al Cuestionario de Kansas

10 (5) HADS indica puntuación total de HADS

(6) FC CHF indica los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, la clase funcional

(7) FF LV indica la fracción de funcionamiento del vertical izquierdo.

**Ejemplo 14.**

15 Para estudiar las propiedades de la propuesta de la composición farmacéutica para el tratamiento de pacientes con hiperplasia benigna de próstata, se utilizaron comprimidos de 300 mg, saturadas de la composición farmacéutica que contenía soluciones acuosas-alcohólicas (6 mg/comprimido) de formas activadas potenciada por afinidad de anticuerpos purificados mediante antígeno prostático específico de conejo (anti-PSA) y NO sintasa endotelial (anti-eNOS) en dosis ultrabajas (ULD), producido por la ultradilución de la solución matriz inicial en 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup>, 100<sup>200</sup> veces, lo que equivale a la mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200 (ULD anti-PSA + anti-eNOS), y comprimidos de 300

20 mg, saturadas de la composición farmacéutica que contenía soluciones acuosas-alcohólicas (3 mg/comprimido) de formas activadas potenciadas de anticuerpos policlonales de conejo purificados por afinidad contra el antígeno prostático específico en dosis ultrabajas (ULD), obtenido por una ultra dilución de la solución de la matriz inicial en 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup>, 100<sup>200</sup> veces, lo que equivale a la mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200 (ULD anti-PSA).

25 La hiperplasia benigna de próstata (HBP) es uno de los trastornos más frecuentes en los varones (Bruskewitz RC, 2003; Rosen R., 2003): por un lado, los estudios epidemiológicos realizados en Rusia, apuntan a un aumento gradual en la frecuencia de HBP del 11,3% en individuos de 40-49 años al 81,4% en individuos de 80 años de edad (Gorilovskiy, LM, 1999), por otro lado, los estudios demográficos realizados por la OMS confirman un aumento significativo en la población mayor de 60 años de edad, superando a cualquier otro grupo de crecimiento por edad.

5 Los principales síntomas de la hiperplasia benigna de próstata son síntomas del tracto urinario, pudiendo causar un gran malestar y una disminución de calidad de vida (Bruskewitz RC, 2003; Lepor H., 2004, O'Leary MP, 2005). En casos graves, la enfermedad puede acarrear complicaciones, tales como la retención aguda de orina, infección del tracto urinario, eritruria, insuficiencia renal (Stepanov, VN, 1999; Jacobsen SJ, 1997; Lepor H., 2004). BPF también se asocia con el desarrollo de la disfunción eréctil en los pacientes (Bruskewitz RC, 2003; Daly MP, 2005).

10 Un estudio abierto comparativo de grupos paralelos de la eficacia y la seguridad de composiciones farmacéuticas que contienen ULD de anti-PSA + ULD de anti-eNOS y ULD de anti-PSA en la mejora de trastornos urinarios causados por la hiperplasia benigna de próstata (HBP), incluyó a 40 pacientes seleccionados de acuerdo con los criterios de inclusión/exclusión. Los pacientes fueron repartidos aleatoriamente en dos grupos, un grupo recibió una píldora tres veces al día durante 12 semanas (n = 21) de ULD de anti-PSA + anti-eNOS, y otro 1 píldora 3 veces al día durante 12 semanas (n = 19) de ULD de anti-PSA. Los grupos fueron comparables en edad, la gravedad de los síntomas de la HBP, los parámetros de la micción y el volumen prostático.

15 El estudio incluyó a pacientes mayores de 45 años de edad con antecedentes de HBP con síntomas similares a los del tracto urinario inferior por no menos de 6 meses, el IPSS  $\geq 13$ , el volumen de la próstata de acuerdo con la ecografía transrectal  $\geq 30$  cm<sup>3</sup>, con una velocidad de flujo urinario máximo de  $\geq 4$  ml/s y  $\leq 15$  ml/s y el volumen mínimo de orina residual igual a 125 ml, con un nivel de PSA  $\leq 4$  ng/ml. Un criterio de inclusión necesario fue la ausencia de ingesta de los siguientes medicamentos en las historias clínicas: finasterida, dutasterida, u otro fármaco experimental 6 meses antes de su inclusión en el estudio, bloqueadores  $\alpha 1$ -adrenérgicos y medicamentos a base de hierbas 4 semanas antes de la inclusión en el estudio, cualquier inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 5 y otros tratamientos de la disfunción eréctil 4 semanas antes de la inclusión en el estudio.

20 El estudio no incluyó a pacientes sometidos a métodos invasivos de tratamiento de la HBP, incluyendo la resección transuretral de próstata, termoterapia, ablación transuretral con aguja, angioplastia con stent y otros, con enfermedad oncológica maligna, demora aguda en la micción, cálculos en la vejiga, estenosis de la uretra, enfermedad de Marion, infecciones del sistema genitourinario en fase de inflamación activa y otros.

25 La eficacia clínica de las composiciones farmacéuticas se evaluó mediante la mejora de los síntomas clínicos del tracto urinario inferior, evaluados mediante cuestionario IPSS (Puntuación Internacional de síntomas de la próstata), los parámetros de la micción (velocidad de flujo urinario máximo y promedio, volumen de la micción, el volumen de orina residual) y el volumen de la próstata basado en los datos de la ecografía transuretral (TU), y también se evaluó la función eréctil sobre la base de los datos obtenidos del cuestionario IIEF (Índice Internacional de Función Eréctil). Los resultados del estudio se muestran en las tablas 22 y 23.

Tabla 22.

	ULD anti-PSA				ULD anti-PSA + ULD anti-eNOS			
	n/N (%) <sup>1</sup>	In., promedio.	12 semanas, promedio.	$\Delta$ , cp	n/N (%) <sup>1</sup>	In., promedio.	12 semanas, promedio	$\Delta$ , cp
Puntuación IPSS	19/19 (100,0)	17,8	11,9	-5,9	20/21 (95,2)	16,0	10,5	-5,6
Puntuación QoL/ (calidad de vida)	19/19 (100,0)	3,4	2,4	-1,0	20/21 (95,2)	3,4	2,3	-1,1
Puntuación IIEF	2/19 (10,5)	17,8	18,6	0,8	4/21 (19,0)	17,5	18,9	1,4
Qmax, ml/s (tasa máxima de orina)	16/19 (84,2)	10,8	13,1	2,2	15/21 (71,4)	11,7	13,7	2,0
Qpromedio, ml/s (tasa promedio de orina)	15/19 (78,9)	5,8	7,1	1,3	18/21 (85,7)	5,8	7,1	1,3

V, ml (volumen de orina)	10/19 (52,6)	218,6	206,8	-11,8	15/21 (71,4)	203,7	252,0	48,3
RV, ml (volumen de orina residual)	15-19 (78,9)	23,6	19,4	-4,3	14/21 (66,6)	19,1	14,1	-5,0
PV, cm <sup>3</sup> (volumen de la próstata)	18/19 (94,7)	55,9	48,9	-7,0	15/21 (71,4)	57,0	52,4	-4,6

<sup>1</sup> - el numerador es un número de pacientes (n) que muestran una mejoría, el denominador es el número total de pacientes en el estudio (N).

Tabla 23.

**Dinámica de las subescalas de síntomas obstructivos e irritativos, y la pregunta 7 del cuestionario IPSS**

	ULD anti-PSA		ULD anti-PSA +anti-eNOS	
	M±DE Visita 1	M±DE Visita 2	M±DE Visita 1	M±DE Visita 2
Obstructivo	10,0±3,02#	6,5±2,81***	8,2±2,96	6,0±3,39**
Irritativo	7,5±2,21&	5,3±1,90***	7,8±2,16&	4,5±2,34***
7ª Pregunta	2,1±0,78	1,9±0,75	2,3±0,90	1,4±0,98***
Obstructivo., % <sup>2</sup>		-33,4±26,85		-25,2±34,50
Irritativo, % <sup>2</sup>		-28,2±1730		-40,3±30,35
7ª Pregunta, % <sup>2</sup>		-2,0±49,61##		-37,7±39,23

5 \* - p <0.05 frente a línea base; \*\* - p <0,01 frente a línea base; \*\*\* - p <0.001 vs línea base

## - p <0,01 vs ULD anti-PSA

<sup>2</sup> - muestra disminución con respecto a la línea de base en %, el valor promedio del grupo

10 Los datos proporcionados confirman que tanto las ULD de anti-PSA, como las ULD de anti-PSA + ULD de anti-eNOS se usaron para tratar eficazmente los síntomas del tracto urinario inferior, aumentar la velocidad de flujo urinario medio y máximo, mejorar la calidad de vida de los pacientes (Tabla 22). El transcurso del estudio no fue largo (12 semanas), por lo tanto, no se observó una disminución en el volumen de la próstata en ningún grupo de estudio. ULD de anti-PSA no afectaron al volumen de orina, lo que aumentó sólo en 52,6% de los pacientes, en promedio el grupo mostró un descenso estadísticamente no significativo del volumen de orina en 11,8 ml (5,4%) en comparación con los valores basales. Al mismo tiempo, los pacientes tratados con ULD de anti-PSA + ULD de anti-eNOS, mostraron un incremento en el volumen de orina del 71,4%, y en promedio, el aumento en el volumen fue de 48,3 ml (23,7%) en comparación con la línea de base.

20 Un análisis de la dinámica de los síntomas obstructivos e irritativos de acuerdo a las subescalas del IPSS, así como las pruebas de nocturia (pregunta 7 del IPSS) de mostraron ambas composiciones farmacéuticas contribuyeron a una disminución de los síntomas de obstrucción e irritación, y también a una disminución de los síntomas de nocturia. Al mismo tiempo, las ULD de anti-PSA + anti-eNOS fueron más eficaces en comparación con ULD de anti-PSA en la disminución de síntomas irritativos del tracto urinario inferior (28,2% frente a 40,3%, p <0,05) e incontinencia urinaria durante la noche (2,0% frente a 37,7%,).

25 Cabe señalar, que las ULD de anti-PSA + ULD de anti-eNOS también son más eficaces en comparación con las ULD de anti-PSA en la mejora de la función eréctil en los pacientes. En el grupo de ULD de anti-PSA + ULD de anti-eNOS, la puntuación del IIEF total (Índice Internacional de Función Eréctil) se incrementó en un 19% de los pacientes (en el grupo



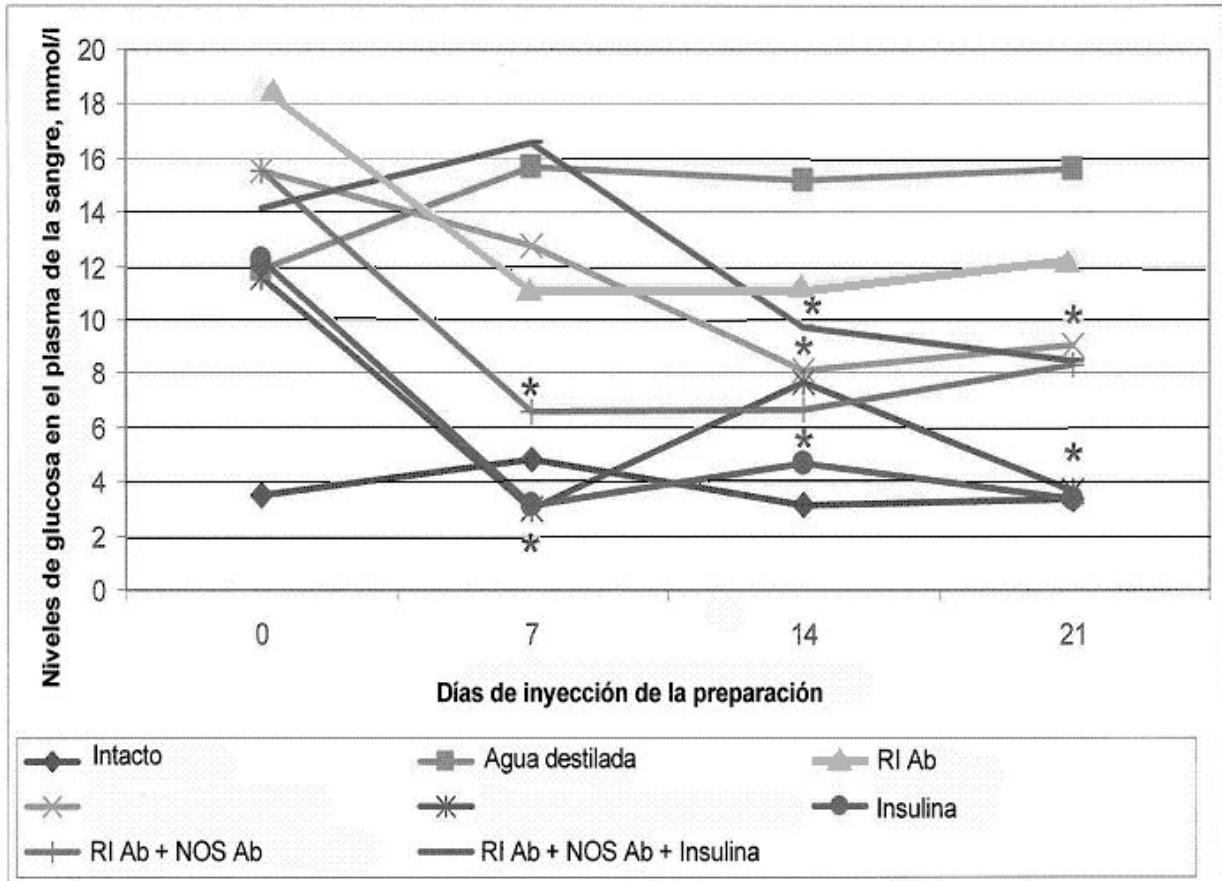
de ULD de anti-PSA en un 10,5%), el aumento promedio de la puntuación del IIEF en el grupo de ULD de anti-PSA + ULD de anti-eNOS fue del 8% frente al 4,5% en el grupo de ULD de anti-PSA.

Las composiciones farmacéuticas mostraron un excelente perfil de seguridad, no se observó ningún efecto adverso relacionado con la medicación administrada en el transcurso de estudio.

- 5 Por lo tanto, ULD de anti-PSA + ULD de anti-eNOS mostraron una mayor eficacia en comparación con la de las ULD de anti-PSA en el tratamiento de problemas urinarios causados por la hiperplasia benigna de próstata. Además, se puso de manifiesto un mayor efecto positivo de ULD de anti-PSA + ULD de anti-eNOS en la función eréctil de los pacientes en comparación con las ULD de anti-PSA.

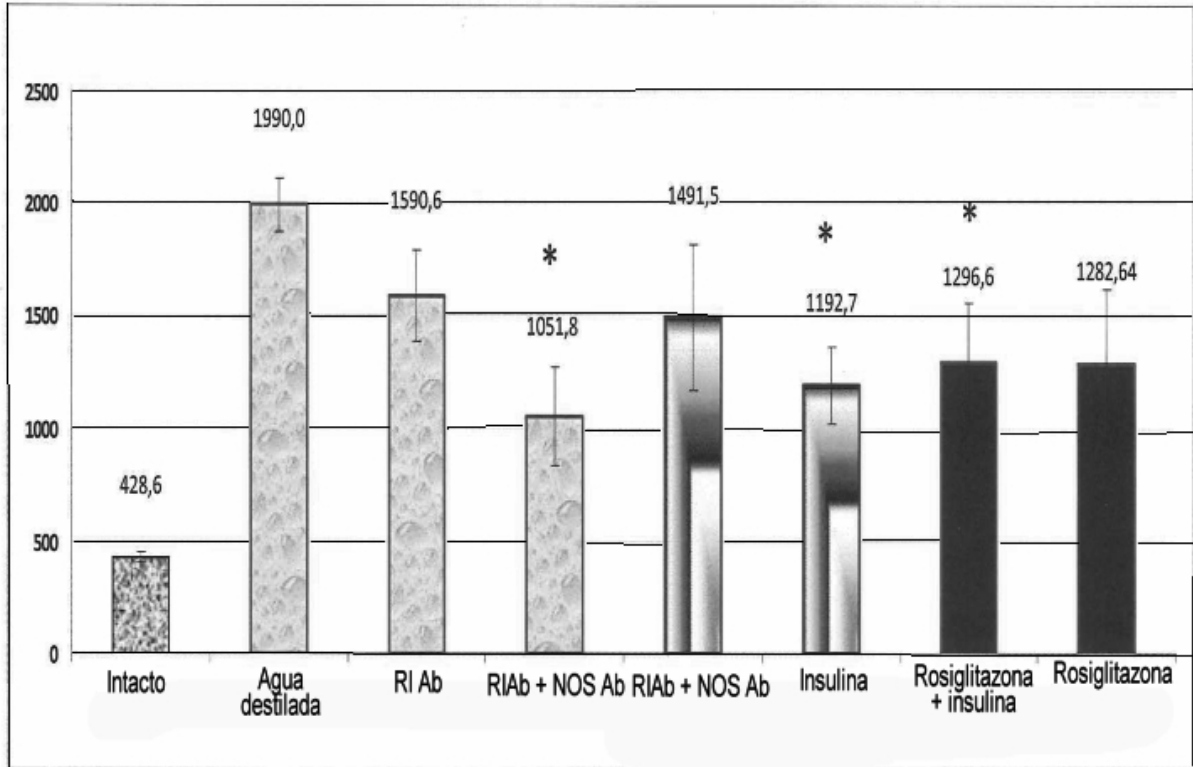
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para aumentar el efecto de una forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena, donde dicho método comprende combinar dicha molécula biológica endógena con una forma activada potenciada de un anticuerpo contra la NO sintasa endotelial, en el que la molécula biológica endógena se selecciona del grupo de la proteína S-100, el antígeno prostático específico, el receptor de la insulina y el receptor de la angiotensina II.
2. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque la forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena es un anticuerpo para proteína S-100.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque la forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena es un anticuerpo contra el antígeno prostático específico.
4. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque la forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena es un anticuerpo contra el receptor de la insulina.
5. El método de la reivindicación 1, caracterizado por la forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena es un anticuerpo para el receptor de la angiotensina II.
- 15 6. Una composición farmacéutica que comprende a) una forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena, y b) una forma activada potenciada de un anticuerpo contra la NO sintasa, en la que la molécula biológica endógena se selecciona del grupo de la proteína S-100, el antígeno prostático específico, el receptor de la insulina y receptor de la angiotensina II.
- 20 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, que comprende además un soporte sólido farmacéuticamente aceptable.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que dicha forma activada potenciada de un anticuerpo contra la NO sintasa endotelial está en forma de una mezcla de diluciones homeopáticas C12, C30 y C200 impregnadas en dicho soporte sólido.
- 25 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, caracterizada porque la forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena que se selecciona del grupo de la proteína S-100, el antígeno prostático específico, el receptor de la insulina y receptor de la angiotensina II, es un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, o natural.
- 30 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, donde dicho anticuerpo contra una molécula biológica endógena que se selecciona del grupo de la proteína S-100, el antígeno prostático específico, el receptor de la insulina y receptor de la angiotensina II, es un anticuerpo policlonal.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que dicho anticuerpo contra la NO sintasa endotelial es un anticuerpo monoclonal, policlonal o natural .
- 35 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que dicho anticuerpo contra la NO sintasa endotelial es un anticuerpo policlonal.
13. Un método para preparar la composición farmacéutica de la reivindicación 6, en el que la forma activada potenciada de un anticuerpo contra una molécula biológica endógena que se selecciona del grupo de la proteína S-100, el antígeno prostático específico, el receptor de la insulina y receptor de la angiotensina II, se prepara por sucesivas diluciones centesimales, junto con agitación de cada dilución.
- 40 14. El método según la reivindicación 13, en el que la forma activada potenciada de un anticuerpo contra la NO sintasa endotelial se prepara por sucesivas diluciones centesimales, junto con agitación de cada dilución.



\*Diferencia estadísticamente significativa en relación al control (agua destilada),  $p < 0,05$

Figura 1



\* Diferencias estadísticamente significativa en relación con el control (agua destilada),  $p < 0,05$

Figura 2

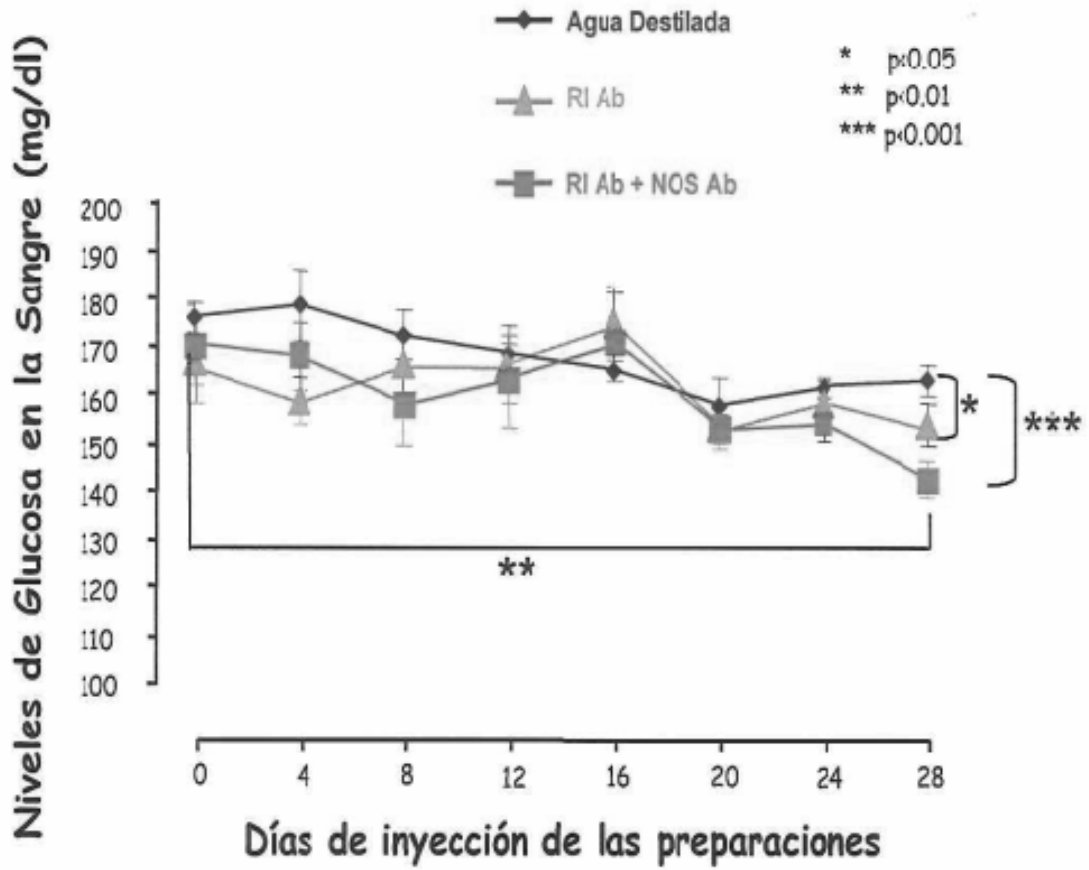
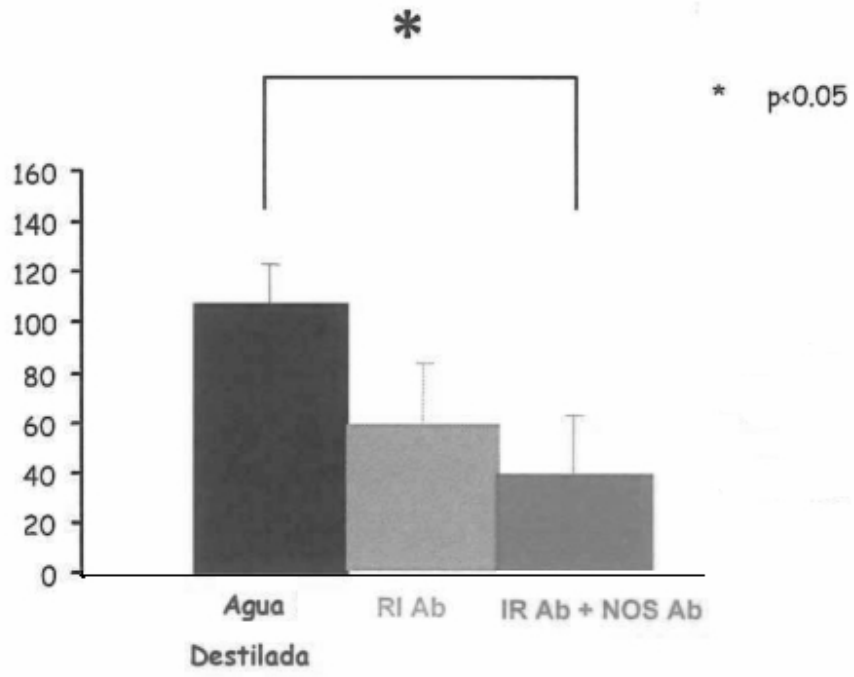


Figura 3

Figura 4



# ES 2 440 393 A2

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Epshtein, Oleg Ilich

<120> Un método para aumentar el efecto de una forma activada potenciada de un anticuerpo

<130> 841-041-PCT

<140> PCT/IB2011/002350

<141> 2011-07-15

<150> RU2010130358

<151> 2010-07-21

<150> RU2011127055

<151> 2011-07-01

<150> RU2010130355

<151> 2010-07-21

<150> RU2011127059

<151> 2011-07-01

<150> RU2010130356

<151> 2010-07-21

<150> RU2011127052

<151> 2011-07-01

<150> RU2010130353

<151> 2010-07-21

<150> RU2011127058

<151> 2011-07-01

<150> RU2010130348

<151> 2010-07-21

<150> RU2011127051

<151> 2011-06-01

<150> RU2010129294

<151> 2010-07-15

<150> RU2010129295

<151> 2010-07-15

<150> RU2011127053

<151> 2011-07-01

<150> RU2010129290

<151> 2010-07-15

<150> RU2010129291

<151> 2010-07-15

<150> RU2010129292

<151> 2010-07-15

<150> RU2011110106

<151> 2011-03-17

<150> RU2010129298

<151> 2010-07-15

<160> 8

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 1205

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..1205

<223> /tipo\_molécula="proteína"  
/organismo="Bos taurus"

ES 2 440 393 A2

<400> 1

Met Gly Asn Leu Lys Ser Val Gly Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys Gly  
1 5 10 15  
Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly Pro Ala  
20 25 30  
Ser Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Pro Ala Thr Pro His  
35 40 45  
Ala Pro Asp His Ser Pro Ala Pro Asn Ser Pro Thr Leu Thr Arg Pro  
50 55 60  
Pro Glu Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn Trp Glu Leu Gly Ser  
65 70 75 80  
Ile Thr Tyr Asp Thr Leu Cys Ala Gln Ser Gln Gln Asp Gly Pro Cys  
85 90 95  
Thr Pro Arg Cys Cys Leu Gly Ser Leu Val Leu Pro Arg Lys Leu Gln  
100 105 110  
Thr Arg Pro Ser Pro Gly Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Leu Ser Gln  
115 120 125  
Ala Arg Asp Phe Ile Asn Gln Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Ser Gly  
130 135 140  
Ser Gln Ala His Glu Glu Arg Leu Gln Glu Val Glu Ala Glu Val Ala  
145 150 155 160  
Ser Thr Gly Thr Tyr His Leu Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala  
165 170 175  
Lys Gln Ala Trp Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp  
180 185 190  
Gly Lys Leu Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Ser Ser Ala Gln Glu  
195 200 205  
Met Phe Thr Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly  
210 215 220  
Asn Leu Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Ala Pro Gly Arg  
225 230 235 240  
Gly Asp Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr  
245 250 255  
Arg Gln Gln Asp Gly Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile  
260 265 270  
Thr Glu Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg Phe  
275 280 285  
Asp Val Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Glu Ala Pro Glu Leu  
290 295 300  
Phe Val Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu Glu His Pro  
305 310 315 320  
Thr Leu Glu Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp Tyr Ala Leu Pro  
325 330 335  
Ala Val Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Ser Ala  
340 345 350  
Ala Pro Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn  
355 360 365  
Leu Cys Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys  
370 375 380  
Met Asp Leu Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala  
385 390 395 400  
Ala Val Glu Ile Asn Leu Ala Val Leu His Ser Phe Gln Leu Ala Lys  
405 410 415  
Val Thr Ile Val Asp His His Ala Ala Thr Val Ser Phe Met Lys His  
420 425 430  
Leu Asp Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala  
435 440 445  
Trp Ile Val Pro Pro Ile Ser Gly Ser Leu Thr Pro Val Phe His Gln  
450 455 460  
Glu Met Val Asn Tyr Ile Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp  
465 470 475 480  
Pro Trp Lys Gly Ser Ala Thr Lys Gly Ala Gly Ile Thr Arg Lys Lys



ES 2 440 393 A2

				485					490				495						
Thr	Phe	Lys	Glu	Val	Ala	Asn	Ala	Val	Lys	Ile	Ser	Ala	Ser	Leu	Met				
			500					505					510						
Gly	Thr	Leu	Met	Ala	Lys	Arg	Val	Lys	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Ala	Ser				
		515					520					525							
Glu	Thr	Gly	Arg	Ala	Gln	Ser	Tyr	Ala	Gln	Gln	Leu	Gly	Arg	Leu	Phe				
	530					535					540								
Arg	Lys	Ala	Phe	Asp	Pro	Arg	Val	Leu	Cys	Met	Asp	Glu	Tyr	Asp	Val				
545				550						555					560				
Val	Ser	Leu	Glu	His	Glu	Ala	Leu	Val	Leu	Val	Val	Thr	Ser	Thr	Phe				
				565				570							575				
Gly	Asn	Gly	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Gly	Glu	Ser	Phe	Ala	Ala	Ala	Leu				
			580					585						590					
Met	Glu	Met	Ser	Gly	Pro	Tyr	Asn	Ser	Ser	Pro	Arg	Pro	Glu	Gln	His				
		595						600					605						
Lys	Ser	Tyr	Lys	Ile	Arg	Phe	Asn	Ser	Val	Ser	Cys	Ser	Asp	Pro	Leu				
	610					615					620								
Val	Ser	Ser	Trp	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys	Glu	Ser	Ser	Asn	Thr	Asp	Ser				
625					630					635					640				
Ala	Gly	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Arg	Phe	Cys	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Ser				
				645					650					655					
Arg	Ala	Tyr	Pro	His	Phe	Cys	Ala	Phe	Ala	Arg	Ala	Val	Asp	Thr	Arg				
			660					665						670					
Leu	Glu	Glu	Leu	Gly	Gly	Glu	Arg	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Asp				
		675					680						685						
Glu	Leu	Cys	Gly	Gln	Glu	Glu	Ala	Phe	Arg	Gly	Trp	Ala	Lys	Ala	Ala				
	690					695					700								
Phe	Gln	Ala	Ser	Cys	Glu	Thr	Phe	Cys	Val	Gly	Glu	Glu	Ala	Lys	Ala				
705					710					715					720				
Ala	Ala	Gln	Asp	Ile	Phe	Ser	Pro	Lys	Arg	Ser	Trp	Lys	Arg	Gln	Arg				
			725						730					735					
Tyr	Arg	Leu	Ser	Thr	Gln	Ala	Glu	Gly	Leu	Gln	Leu	Leu	Pro	Gly	Leu				
		740						745						750					
Ile	His	Val	His	Arg	Arg	Lys	Met	Phe	Gln	Ala	Thr	Val	Leu	Ser	Val				
		755					760						765						
Glu	Asn	Leu	Gln	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Ile	Leu	Val	Arg				
	770					775						780							
Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Glu	Gly	Leu	Gln	Tyr	Gln	Pro	Gly	Asp	His				
785					790					795				800					
Ile	Gly	Ile	Cys	Pro	Pro	Asn	Arg	Pro	Gly	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Leu				
				805					810					815					
Ser	Arg	Val	Glu	Asp	Pro	Pro	Pro	Pro	Thr	Glu	Ser	Val	Ala	Val	Glu				
		820						825						830					
Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Ser	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Ser	Trp	Val	Arg				
		835					840						845						
Asp	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Cys	Thr	Leu	Arg	Gln	Ala	Leu	Thr	Phe	Phe				
	850					855					860								
Leu	Asp	Ile	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Ser				
865					870					875					880				
Thr	Leu	Ala	Glu	Glu	Pro	Ser	Glu	Gln	Gln	Glu	Leu	Glu	Thr	Leu	Ser				
				885						890				895					
Gln	Asp	Pro	Arg	Arg	Tyr	Glu	Glu	Trp	Lys	Trp	Phe	Arg	Cys	Pro	Thr				
		900						905						910					
Leu	Leu	Glu	Val	Leu	Glu	Gln	Phe	Pro	Ser	Val	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro				
		915					920							925					
Leu	Leu	Leu	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Leu	Gln	Pro	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Val				
	930					935						940							
Ser	Ser	Ala	Pro	Asn	Ala	His	Pro	Gly	Glu	Val	His	Leu	Thr	Val	Ala				
945					950					955					960				
Val	Leu	Ala	Tyr	Arg	Thr	Gln	Asp	Gly	Leu	Gly	Pro	Leu	His	Tyr	Gly				
				965					970						975				
Val	Cys	Ser	Thr	Trp	Leu	Ser	Gln	Leu	Lys	Thr	Gly	Asp	Pro	Val	Pro				
			980						985					990					

ES 2 440 393 A2

Cys Phe Ile Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro Asp Pro Tyr  
 995 1000 1005  
 Val Pro Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg  
 1010 1015 1020  
 Gly Phe Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu Ser Lys Gly Leu Gln  
 1025 1030 1035 1040  
 Pro Ala Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Cys Ser Gln Leu Asp  
 1045 1050 1055  
 His Leu Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asp Ala Gln Glu Arg Gly Val Phe  
 1060 1065 1070  
 Gly Arg Val Leu Thr Ala Phe Ser Arg Glu Pro Asp Ser Pro Lys Thr  
 1075 1080 1085  
 Tyr Val Gln Asp Ile Leu Arg Thr Glu Leu Ala Ala Glu Val His Arg  
 1090 1095 1100  
 Val Leu Cys Leu Glu Arg Gly His Met Phe Val Cys Gly Asp Val Thr  
 1105 1110 1115 1120  
 Met Ala Thr Ser Val Leu Gln Thr Val Gln Arg Ile Leu Ala Thr Glu  
 1125 1130 1135  
 Gly Asp Met Glu Leu Asp Glu Ala Gly Asp Val Ile Gly Val Leu Arg  
 1140 1145 1150  
 Asp Gln Gln Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr  
 1155 1160 1165  
 Gln Glu Val Thr Ser Arg Ile Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu  
 1170 1175 1180  
 Arg His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro  
 1185 1190 1195 1200  
 Asp Thr Pro Gly Pro  
 1205

<210> 2  
 <211> 1203  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> SOURCE  
 <222> 1..1203  
 <223> /tipo\_molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

<400> 2  
 Met Gly Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly Pro Ala  
 20 25 30  
 Thr Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Ser Leu Leu Pro Pro  
 35 40 45  
 Ala Pro Glu His Ser Pro Pro Ser Ser Pro Leu Thr Gln Pro Pro Glu  
 50 55 60  
 Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn Trp Glu Val Gly Ser Ile Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Asp Thr Leu Ser Ala Gln Ala Gln Gln Asp Gly Pro Cys Thr Pro  
 85 90 95  
 Arg Arg Cys Leu Gly Ser Leu Val Phe Pro Arg Lys Leu Gln Gly Arg  
 100 105 110  
 Pro Ser Pro Gly Pro Pro Ala Pro Glu Gln Leu Leu Ser Gln Ala Arg  
 115 120 125  
 Asp Phe Ile Asn Gln Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Ser Gly Ser Gln  
 130 135 140  
 Ala His Glu Gln Arg Leu Gln Glu Val Glu Ala Glu Val Ala Ala Thr  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Tyr Gln Leu Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala Lys Gln

ES 2 440 393 A2

Ala Trp Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Gly Lys  
 165 170 175  
 180 185 190  
 Leu Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Arg Ser Ala Gln Glu Met Phe  
 195 200 205  
 Thr Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly Asn Leu  
 210 215 220  
 Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Cys Pro Gly Arg Gly Asp  
 225 230 235 240  
 Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr Arg Gln  
 245 250 255  
 Gln Asp Gly Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile Thr Glu  
 260 265 270  
 Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg Phe Asp Val  
 275 280 285  
 Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Glu Pro Pro Glu Leu Phe Leu  
 290 295 300  
 Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu Glu His Pro Thr Leu  
 305 310 315 320  
 Glu Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val  
 325 330 335  
 Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Pro Ala Ala Pro  
 340 345 350  
 Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys  
 355 360 365  
 Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp  
 370 375 380  
 Leu Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val  
 385 390 395 400  
 Glu Ile Asn Val Ala Val Leu His Ser Tyr Gln Leu Ala Lys Val Thr  
 405 410 415  
 Ile Val Asp His Ala Ala Thr Ala Ser Phe Met Lys His Leu Glu  
 420 425 430  
 Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile  
 435 440 445  
 Val Pro Pro Ile Ser Gly Ser Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met  
 450 455 460  
 Val Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp  
 465 470 475 480  
 Lys Gly Ser Ala Ala Lys Gly Thr Gly Ile Thr Arg Lys Lys Thr Phe  
 485 490 495  
 Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser Leu Met Gly Thr  
 500 505 510  
 Val Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Gly Ser Glu Thr  
 515 520 525  
 Gly Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu Gly Arg Leu Phe Arg Lys  
 530 535 540  
 Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser  
 545 550 555 560  
 Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn  
 565 570 575  
 Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ala Leu Met Glu  
 580 585 590  
 Met Ser Gly Pro Tyr Asn Ser Ser Pro Arg Pro Glu Gln His Lys Ser  
 595 600 605  
 Tyr Lys Ile Arg Phe Asn Ser Ile Ser Cys Ser Asp Pro Leu Val Ser  
 610 615 620  
 Ser Trp Arg Arg Lys Arg Lys Glu Ser Ser Asn Thr Asp Ser Ala Gly  
 625 630 635 640  
 Ala Leu Gly Thr Leu Arg Phe Cys Val Phe Gly Leu Gly Ser Arg Ala  
 645 650 655  
 Tyr Pro His Phe Cys Ala Phe Ala Arg Ala Val Asp Thr Arg Leu Glu  
 660 665 670

ES 2 440 393 A2

Glu Leu Gly Gly Glu Arg Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Asp Glu Leu  
 675 680 685  
 Cys Gly Gln Glu Glu Ala Phe Arg Gly Trp Ala Gln Ala Ala Phe Gln  
 690 695 700  
 Ala Ala Cys Glu Thr Phe Cys Val Gly Glu Asp Ala Lys Ala Ala Ala  
 705 710 715 720  
 Arg Asp Ile Phe Ser Pro Lys Arg Ser Trp Lys Arg Gln Arg Tyr Arg  
 725 730 735  
 Leu Ser Ala Gln Ala Glu Gly Leu Gln Leu Leu Pro Gly Leu Ile His  
 740 745 750  
 Val His Arg Arg Lys Met Phe Gln Ala Thr Ile Arg Ser Val Glu Asn  
 755 760 765  
 Leu Gln Ser Ser Lys Ser Thr Arg Ala Thr Ile Leu Val Arg Leu Asp  
 770 775 780  
 Thr Gly Gly Gln Glu Gly Leu Gln Tyr Gln Pro Gly Asp His Ile Gly  
 785 790 795 800  
 Val Cys Pro Pro Asn Arg Pro Gly Leu Val Glu Ala Leu Leu Ser Arg  
 805 810 815  
 Val Glu Asp Pro Pro Ala Pro Thr Glu Pro Val Ala Val Glu Gln Leu  
 820 825 830  
 Glu Lys Gly Ser Pro Gly Gly Pro Pro Pro Gly Trp Val Arg Asp Pro  
 835 840 845  
 Arg Leu Pro Pro Cys Thr Leu Arg Gln Ala Leu Thr Phe Phe Leu Asp  
 850 855 860  
 Ile Thr Ser Pro Pro Ser Pro Gln Leu Leu Arg Leu Leu Ser Thr Leu  
 865 870 875 880  
 Ala Glu Glu Pro Arg Glu Gln Gln Glu Leu Glu Ala Leu Ser Gln Asp  
 885 890 895  
 Pro Arg Arg Tyr Glu Glu Trp Lys Trp Phe Arg Cys Pro Thr Leu Leu  
 900 905 910  
 Glu Val Leu Glu Gln Phe Pro Ser Val Ala Leu Pro Ala Pro Leu Leu  
 915 920 925  
 Leu Thr Gln Leu Pro Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Val Ser Ser  
 930 935 940  
 Ala Pro Ser Thr His Pro Gly Glu Ile His Leu Thr Val Ala Val Leu  
 945 950 955 960  
 Ala Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Leu Gly Pro Leu His Tyr Gly Val Cys  
 965 970 975  
 Ser Thr Trp Leu Ser Gln Leu Lys Pro Gly Asp Pro Val Pro Cys Phe  
 980 985 990  
 Ile Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro Asp Pro Ser Leu Pro  
 995 1000 1005  
 Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg Gly Phe  
 1010 1015 1020  
 Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu Ser Lys Gly Leu Gln Pro Thr  
 1025 1030 1035 1040  
 Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Cys Ser Gln Leu Asp His Leu  
 1045 1050 1055  
 Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asn Ala Gln Gln Arg Gly Val Phe Gly Arg  
 1060 1065 1070  
 Val Leu Thr Ala Phe Ser Arg Glu Pro Asp Asn Pro Lys Thr Tyr Val  
 1075 1080 1085  
 Gln Asp Ile Leu Arg Thr Glu Leu Ala Ala Glu Val His Arg Val Leu  
 1090 1095 1100  
 Cys Leu Glu Arg Gly His Met Phe Val Cys Gly Asp Val Thr Met Ala  
 1105 1110 1115 1120  
 Thr Asn Val Leu Gln Thr Val Gln Arg Ile Leu Ala Thr Glu Gly Asp  
 1125 1130 1135  
 Met Glu Leu Asp Glu Ala Gly Asp Val Ile Gly Val Leu Arg Asp Gln  
 1140 1145 1150  
 Gln Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr Gln Glu  
 1155 1160 1165  
 Val Thr Ser Arg Ile Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu Arg Gln

ES 2 440 393 A2

1170 1175 1180  
Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Ser Asp Thr  
1185 1190 1195 1200  
Asn Ser Pro

<210> 3  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<220>  
<221> SOURCE  
<222> 1..4  
<223> /tipo\_molécula="proteína"  
/organismo="Bos taurus"

<400> 3  
Pro Trp Ala Phe  
1

<210> 4  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<220>  
<221> SOURCE  
<222> 1..4  
<223> /tipo\_molécula="proteína"  
/organismo="Bos taurus"

<400> 4  
Gly Ala Val Pro  
1

<210> 5  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<220>  
<221> SOURCE  
<222> 1..21  
<223> /tipo\_molécula="proteína"  
/organismo="Bos taurus"

<400> 5  
Arg His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro  
1 5 10 15  
Asp Thr Pro Gly Pro  
20

<210> 6  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<220>

## ES 2 440 393 A2

<221> SOURCE  
<222> 1..12  
<223> /tipo\_molécula="proteína"  
/organismo="Bos taurus"

<400> 6  
Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro Asp Thr Pro Gly Pro  
1 5 10

<210> 7  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<220>  
<221> SOURCE  
<222> 1..11  
<223> /tipo\_molécula="proteína"  
/organismo="Bos taurus"

<400> 7  
His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp  
1 5 10

<210> 8  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<220>  
<221> SOURCE  
<222> 1..20  
<223> /tipo\_molécula="proteína"  
/organismo="Bos taurus"

<400> 8  
His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro Asp  
1 5 10 15  
Thr Pro Gly Pro  
20