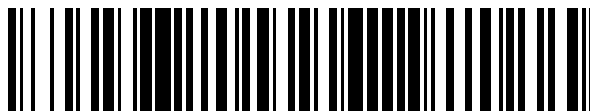


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 557**

21 Número de solicitud: 201390021

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 31/18** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**15.07.2011**

30 Prioridad:

**06.08.2010 RU 2010133045**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**04.01.2016**

71 Solicitantes:

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

72 Inventor/es:

**EPSHTEIN, Oleg Iliich y  
TARASOV, Sergei Alexandrovich**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

54 Título: **Fármaco y uso para preparar un medicamento destinado a la prevención de la infección del VIH y al tratamiento de enfermedades causadas por el VIH, incluido el SIDA**

57 Resumen:

Fármaco y uso para preparar un medicamento destinado a la prevención de la infección del VIH y al tratamiento de enfermedades causadas por el VIH, incluido el SIDA. El fármaco comprende una forma activada potenciada de anticuerpos contra un antígeno que es una proteína o péptido del sistema inmune que interactúa con el VIH o que tiene un contenido y/o actividad funcional que cambia en relación con la infección del VIH. Además, la forma activada potenciada de anticuerpos contra un antígeno que es una proteína o péptido del sistema inmune que interactúa con el VIH o que tiene un contenido y/o actividad funcional que cambia en relación con la infección del VIH se usa para preparar un medicamento destinado a la prevención de la infección del VIH y al tratamiento de enfermedades causadas por el VIH, incluido el SIDA.

ES 2 555 557 A2

## DESCRIPCIÓN

Fármaco y uso para preparar un medicamento destinado a la prevención de la infección del VIH y al tratamiento de enfermedades causadas por el VIH, incluido el SIDA

### **Campo técnico**

- 5 La invención pertenece al campo de la medicina y puede ser usada para preparar un medicamento destinado a la prevención eficaz de la infección del VIH, la prevención y el tratamiento de enfermedades causadas por el VIH, incluido el SIDA.

### **Técnica anterior**

- 10 La técnica anterior incluye un fármaco para el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluidas enfermedades virales, en base a la forma activada de dosis muy pequeñas de anticuerpos anti-interferón (RU 2192888 C1, A61K39/395, 20.11.2002). Sin embargo, este fármaco puede no ser eficaz en la prevención de la infección del VIH, como tampoco en la prevención y tratamiento de un amplio espectro de enfermedades causadas por el VIH o asociadas con el VIH, incluido el SIDA.

### **15 Divulgación de la invención**

- La invención está dirigida al descubrimiento de un fármaco complejo sin marcados efectos adversos, que permita la prevención eficaz de la infección del VIH, así como la prevención y el tratamiento eficaz de las enfermedades causadas por el VIH o asociadas al VIH, incluyendo infecciones e infestaciones, neoplasmas malignos y el SIDA en los sujetos positivos para el VIH.
- 20

- La solución al problema planteado se basa en que el fármaco para la prevención de la infección del VIH, y la prevención y el tratamiento de enfermedades causadas por el VIH o asociadas con el VIH, incluido el SIDA, conforme a la invención, contiene una forma activada - potenciada de anticuerpos contra un antígeno – una proteína o péptido del sistema inmune o, principalmente, producido por el sistema inmune, el cual interactúa con el VIH, o cuyo contenido y/o actividad funcional cambia en presencia del VIH.
- 25

Además es posible utilizar la forma activada - potenciada de anticuerpos dirigidos predominantemente contra el antígeno disuelto (o contra el antígeno soluble, es decir, el antígeno, no unido a la membrana externa de las células del sistema inmune).

- 30 Las citoquinas (a excepción del interferón gamma) se pueden usar como antígenos solubles.

Además, es posible usar también la forma activada - potenciada de anticuerpos dirigidos predominantemente contra el antígeno unido a la membrana externa de las células del sistema inmune.

5 Para esto, se usan los receptores de células inmunocompetentes en calidad de antígeno unido a la membrana externa de las células del sistema inmune.

Además, en calidad de antígeno unido a la membrana externa de las células del sistema inmune es posible usar los clústeres de diferenciación, (a excepción de las moléculas CD4 de los linfocitos T).

10 La forma activada - potenciada de anticuerpos contra antígenos disueltos o la forma activada - potenciada de anticuerpos contra antígenos unidos a la membrana externa de las células del sistema inmune se usa en forma de solución acuosa o acuoso-alcohólica activada - potenciada, cuya actividad está basada en el proceso de dilución múltiple seriada de la solución *stock* (inicial) de los anticuerpos en un disolvente acuoso o acuoso-alcohólico en combinación con el impacto mecánico externo de agitación vertical después  
15 de cada dilución.

Para ello, el fármaco reivindicado puede ser diseñado en forma sólida de dosificación de composición farmacéutica, la cual contiene la cantidad tecnológicamente necesaria (eficaz) del vehículo neutro saturado con la mezcla de las soluciones acuosas o acuso-alcohólicas de las formas activadas - potenciadas de anticuerpos contra los antígenos  
20 disueltos o de la forma activada - potenciada de anticuerpos contra los antígenos unidos a la membrana externa de las células del sistema inmune, y los excipientes farmacéuticamente aceptables, dentro de los cuales están, por ejemplo, la lactosa, la celulosa microcristalina y el estearato de magnesio.

25 Las soluciones acuosas o acuoso-alcohólicas de las formas activadas - potenciadas de anticuerpos contra los antígenos disueltos o contra los antígenos unidos a la membrana externa de las células del sistema inmune pueden ser obtenidas por dilución múltiple consecutiva de la solución *stock* (inicial) de anticuerpos, en combinación con el impacto mecánico externo de agitación vertical después de cada dilución. La concentración de la solución *stock* es 0,5 - 5,0 mg/ml.

30 La forma activada - potenciada de anticuerpos puede ser usada en forma de mezcla de mezcla de diluciones distintas, principalmente centesimales, por tecnología homeopática.

La solución del problema planteado se asegura también por que en el modo de prevención de la infección del VIH y el tratamiento eficaz de las enfermedades causadas

por el VIH o asociadas con el VIH, incluido el SIDA conforme a la invención, se usa la forma activada - potenciada de anticuerpos contra un antígeno (proteína o péptido del sistema inmune, o producido predominantemente por el sistema inmune) que reacciona con el VIH o cuyo contenido y/o actividad funcional se altera por la infección del VIH.

- 5 La forma activada - potenciada de anticuerpos contra los antígenos disueltos o la forma activada - potenciada de anticuerpos a los antígenos unidos a la membrana externa de las células del sistema inmune se usan en forma de solución acuosa o acuoso-alcohólica activada - potenciada de cada componente, cuya actividad está condicionada por el proceso de dilución múltiple de la solución *stock* (inicial) de anticuerpos en un disolvente  
10 acuoso o acuoso-alcohólico en combinación con el impacto mecánico externo de agitación vertical después de cada dilución.

Las soluciones de las formas acuosas o acuoso-alcohólicas activadas - potenciadas de anticuerpos contra los antígenos disueltos o contra los antígenos unidos a la membrana externa de las células del sistema inmune se obtienen preferentemente por medio de la  
15 dilución múltiple seriada de la solución *stock* (inicial) de los anticuerpos, en combinación con el impacto mecánico externo de agitación vertical después de cada dilución; la concentración de la solución *stock* es 0,5 - 5,0 mg/ml.

Conforme a la invención, la forma activada - potenciada es una forma de anticuerpos preparada según la tecnología homeopática de potenciación por medio de la dilución  
20 múltiple seriada de la solución *stock* (inicial) de anticuerpos en combinación de la acción externa de agitación vertical para cada dilución, la cual posee actividad en los modelos farmacológicos y/o en los métodos clínicos de prevención de la infección del VIH, la prevención y el tratamiento de enfermedades causadas por el VIH o enfermedades asociadas con el VIH, incluido el SIDA.

- 25 El uso propuesto de la forma activada - potenciada de anticuerpos contra antígenos disueltos (por ejemplo, contra el factor de necrosis tumoral alfa o el interferón alfa humano) o contra antígenos unidos a la membrana externa de las células del sistema inmune (por ejemplo, contra el receptor CD8) conduce al inesperado efecto terapéutico que consiste en una mayor eficiencia del fármaco, tanto en la prevención de la infección  
30 del VIH, como en la prevención y el tratamiento de enfermedades causadas por el VIH o asociadas con el VIH, incluido el SIDA.

Se ha confirmado experimentalmente que el fármaco reivindicado se caracteriza por una elevada eficacia preventiva respecto al VIH, previniendo la penetración en las células del virus de la inmunodeficiencia humana y su replicación intracelular y, así, puede usarse

tanto para el tratamiento eficaz, así como para la prevención de las enfermedades virales con tendencia a la evolución crónica, incluso para la prevención secundaria de la infección del VIH.

5 Es posible el uso del fármaco reivindicado en combinación con agentes antirretrovirales, incluidos agentes complejos como los inhibidores de la transcriptasa inversa (por ejemplo, derivados de zidovudina), lo que permite reducir la dosis de los agentes antirretrovirales manteniendo la alta eficacia de la terapia y reduce la tasa de efectos indeseados.

Realizaciones de la invención

10 El fármaco se prepara, principalmente, del siguiente modo.

Para la preparación de la forma activada - potenciada de los componentes activos se usan anticuerpos monoclonales o, principalmente, policlonales, los cuales pueden ser obtenidos por tecnologías conocidas, en particular, las técnicas descritas, por ejemplo, en el libro: *Immunological methods*, en la edición G. Frimel, M., "Meditsyna", 1987, p. 9-33  
15 [Ruso]; o en el artículo de Laffly E., Sodoyer R. "*Hum. Antibodies. Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after*" – 2005 – Vol. 14. – N 1-2. P.33-55.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen, por ejemplo, mediante la tecnología de los hibridomas. En ella, la fase inicial del proceso incluye la inmunización, basada en principios ya desarrollados para la preparación de los antisueros policlonales. Las  
20 posteriores etapas del proceso implican la obtención de células de hibridomas, productoras de clones de anticuerpos de la misma especificidad. Su separación se realiza con los mismos métodos que se utilizan para obtener los antisueros policlonales.

Los anticuerpos policlonales pueden ser obtenidos por la inmunización activa de  
25 animales. Para esto, se administra a los animales, siguiendo un esquema especialmente elaborado, una serie de inyecciones de la sustancia requerida según la invención - el antígeno o el antígeno conjugado (la proteína o el péptido del sistema inmune o, principalmente producido por el sistema inmune, que reacciona con el VIH o cuyo contenido y/o la actividad funcional se altera por la infección del VIH). Como resultado de la realización de tal procedimiento se obtiene un antisuero monoespecífico con un alto  
30 contenido de anticuerpos, el cual es usado para obtener la forma activada - potenciada. En caso necesario se realiza la purificación de los anticuerpos existentes en el antisuero, por ejemplo, por métodos de cromatografía de afinidad, fraccionamiento con sales o cromatografía de intercambio iónico.

Por ejemplo, para la preparación del fármaco reivindicado pueden ser usados anticuerpos policlonales contra el factor de necrosis tumoral alfa, los cuales se usan como una solución primaria o *stock* (inicial) (concentración de 0,5 - 5,0 mg/ml), para la posterior preparación de la forma activada - potenciada.

- 5 Para la preparación del fármaco reivindicado se usan, preferiblemente, anticuerpos policlonales, que pueden ser obtenidos por la inmunización de los conejos, del modo siguiente.

Por ejemplo, los anticuerpos policlonales contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) pueden ser obtenidos con el uso de moléculas enteras del factor del TNF- $\alpha$  con la

- 10 secuencia siguiente:

1 MSTESMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRRC LFLSLFSFLI VAGATTLFCL  
LHFGVIGPQR

61 EEFPRDLSLI SPLAQAVRSS SRTPSDKPVA HVVANPQAEG QLQWLNRRAN  
ALLANGVELR

- 15 121 DNQLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPSTHV LLTHTISRIA VSYQTKVNLL  
SAIKSPCQRE

181 TPEGAEAKPW YEPIYLGGVF QLEKGDRLSA EINRPDYLDF AESGQVYFGIIAL

- 20 Para la obtención de los anticuerpos policlonales contra el factor de necrosis tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ ) es posible el uso de un fragmento polipeptídico del factor de necrosis tumoral alfa seleccionado, por ejemplo, de las secuencias siguientes:

84-88:

PSDKP

93-97:

VANPQ

- 25 65-199:

RDLSLI SPLAQAVRSS SRTPSDKPVA HVVANPQAEG QLQWLNRRAN ALLANGVELR  
DNQLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPSTHV LLTHTISRIA VSYQTKVNLL SAIKSPCQRE  
TPEGAEAKPW YEPIYLGGV

77-93:

- 30 RSS SRTPSDKPVA HVV

## ES 2 555 557 A2

32-54:

GGPQGSRRRC LFLSLFSFLI VAGA

56-73:

IGPQR EEFPRDLSLI SPL

5 123- 160:

QLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPSTHV LLTHTISRIA

176-190:

PCQRE TPEGAEAKPW

5- 45:

10 SMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRRC LFLSL

150-184:

V LLTHTISRIA VSYQTKVNLL SAIKSPCQRE TPEG

77-233:

VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGV

15 ELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQ

TKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSA

EINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL.

Antes de la extracción de sangre, durante 7 - 9 días se realiza 1-3 inyecciones intravenosas para aumentar el nivel de anticuerpos. Durante el proceso de inmunización, a los conejos se les extrae pequeñas muestras de sangre para la valoración de la cantidad de anticuerpos. El nivel máximo de respuesta inmune a la administración de la mayoría de antígenos es alcanzado en 40-60 días después de la primera inyección. Después de finalizar el primer ciclo de inmunización de los conejos, se deja restablecer su salud durante 30 días y se realiza la reinmunización, la cual incluye las 1-3 inyecciones intravenosas. Para la obtención del antisuero de los conejos inmunizados se recoge sangre en un tubo de centrifuga de 50 ml de volumen. Con ayuda de una espátula de madera se quita de las paredes del tubo los coágulos que se han formado y se coloca la espátula en el coágulo formado en el centro del tubo. La sangre se coloca en el refrigerador (temperatura 4°C) durante una noche. Al día siguiente se quita el coágulo que se ha pegado a la espátula, y el líquido restante se centrifuga a 13000g durante 10

minutos. El sobrenadante (el líquido sobre el precipitado) es el antisuero. El antisuero obtenido debe ser de color amarillo. Se puede añadir 20% de NaN<sub>3</sub> al antisuero hasta la concentración final de 0,02% y se debería conservar congelado hasta su utilización a -20°C de temperatura (o sin adición de NaN<sub>3</sub> a -70°C de temperatura). La separación de los anticuerpos del antisuero contra el factor de necrosis tumoral – alfa se puede hacer del modo siguiente:

1. Se disuelve 10 ml del antisuero de conejo en 2 veces 0,15 M NaCl, se añade 6,26 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se mezcla y se incuba durante 12-16 h a 4°C;

2. Se quita el precipitado formado por medio de la centrifugación, se disuelve en 10 ml de tampón fosfato y luego se dializa contra el mismo tampón durante una noche a temperatura ambiente;

3. Después de quitar el sedimento por medio de la centrifugación, se lleva la solución a la columna con DEAE-celulosa, equilibrada con el tampón fosfato;

4. La fracción de anticuerpos se determina midiendo la densidad óptica del eluato a 280 nm.

La purificación de los anticuerpos se realiza por el método de cromatografía de afinidad en la columna con el antígeno, por medio de la unión de los anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral alfa con el antígeno (factor de necrosis tumoral alfa), conectado a la matriz insoluble de la columna, con su posterior elución de los anticuerpos mediante soluciones concentradas de sal.

La solución tampón obtenida de esta manera, de anticuerpos policlonales contra el factor de necrosis tumoral alfa con concentración de 0,5 - 5,0 mg/ml, preferiblemente 2,0 ÷ 3,0 mg/ml es usada como solución matriz (inicial) para la posterior preparación de la forma activada - potenciada de los anticuerpos.

Los anticuerpos policlonales contra el interferón alfa humano se obtienen por el método arriba indicado, usando en calidad de inmunógeno (antígeno) para la inmunización de los conejos el adyuvante y la molécula entera de interferón alfa humano de una de las siguientes secuencias:

Interferón alfa humano (subtipo 2):

MALTFALLVA LLVLSCKSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLML  
 LAQMRKISLF SCLKDRHDFG  
 FPQEEFGNQF QKAETIPVLH EMIQQIFNLF STKDSSAAWD  
 ETLLDKFYTE LYQQLNDLEA



## ES 2 555 557 A2

CVIQGVGVTE TPLMKEDSIL AVRKYFQRIT LYLKEKKYSP  
CAWEVVRAEIMRSFSLSTNL  
QESLRSKE

Interferón alfa humano (subtipo 1/13):

5 MASPfallmV LVLsckSSC SLGCDLPETH SLDNRRTLML L  
AQMSRISPS SCLMDRHDFG  
FPQEEFDGNQ FQKAPAIsvL HELIQQIFNL FTTKDSSAAW  
DEDLLDKFCT ELYQQLNDLE  
ACVMQEERVG ETPLMNADSILAVKKYFRRI TLYLTEKKYS  
10 PCAWEVVRAE IMRSLSLSTN  
LQERLRRKE

Interferón alfa humano (subtipo 17):

MALSFLLMA VLvLSYKSIC SLGCDLPQTH SLGNRRALIL  
LAQMGRISPF SCLKDRHDFG  
15 LPQEEFDGNQ FQKTQAISVL HEMIQQTFNL FSTEDSSAAW  
EQSLLEKFST ELYQQLNLE  
ACVIOEVGME ETPLMNEDSI LAVRKYFQRI TLYLTEKKYS  
PCAWEVVRAEIMRSLSFSTN  
LQKILRRKD

20 Interferón alfa humano (subtipo 4):

MALSFLLMA VLvLSYKSIC SLGCDLPQTH SLGNRRALIL  
LAQMGRISHF SCLKDRHDFG  
FPPEEFDGHQ FQKAQAISVL HEMIQQTFNL FSTEDSSAAW  
EQSLLEKFST ELYQQLNDLE  
25 ACVIOEVGVE ETPLMNEDSI LAVRKYFQRI TLYLTEKKYS  
PCAWEVVRAE IMRSLSFSTN  
LQKRLRRKD

Interferón alfa humano (subtipo 8):

MALTFYLLVA LVVLSYKSFS SLGCDLPQTH SLGNRRALIL  
30 LAQMRRISPF SCLKDRHDFE  
FPQEEFDDKQ FQKAQAISVL HEMIQQTFNL FSTKDSSAAL  
DETLLDEFYIELDQQLNDLE  
SCVMQEVGVI ESPLMYEDSI LAVRKYFQRI TLYLTEKKYS  
SCAWEVVRAE IMRSFSLsIN  
35 LQKRLKSKE

**Interferón alfa humano (subtipo 7):**

MARFSLLMV VLVLSYKSIC SLGCDLPQTH SLRNRRALIL  
 LAQMGRISPF SCLKDRHEFR  
 FPEEEFDGHQ FQKTQAISVL HEMIQQTFNL FSTEDSSAAW  
 5 EQSLLEKFST ELYQQLNDLE  
 ACVIOEVGVE ETPLMNEDFI LAVRKYFQRI TLYLMEKKYS  
 PCAWEVVRAE IMRSFSFSTN  
 LKKGLRRKD

**Interferón alfa humano (subtipo 21):**

10 MALSFLLMA VLVLSYKSIC SLGCDLPQTH SLGNRRALIL  
 LAQMGRISPF SCLKDRHDFG  
 FPQEEFDGNQ FQKAQAISVL HEMIQQTFNL FSTKDSSATW  
 EQSLLEKFST ELNQQQLNDLE  
 ACVIOEVGVE ETPLMNVDSI LAVKKYFQRI TLYLTEKKYS  
 15 PCAWEVVRAE IMRSFSLSKI  
 FQERLRRKE

**Interferón alfa humano (subtipo 10):**

MALSFLLMA VLVLSYKSIC SLGCDLPQTH SLGNRRALIL  
 LGQMGRISPF SCLKDRHDFR  
 20 IPQEEFDGNQ FQKAQAISVL HEMIQQTFNL FSTEDSSAAW  
 EQSLLEKFST ELYQQLNDLE  
 ACVIOEVGVE ETPLMNEDSI LAVRKYFQRI TLYLIERKYS  
 PCAWEVVRAE IMRSLSFSTN  
 LQKRLRRKD

**Interferón alfa humano (subtipo 14):**

MALPFALMMA LVVLSCKSSC SLGCNLSQTH SLNNRRTLML  
 MAQMRRISPF SCLKDRHDFE  
 FPQEEFDGNQ FQKAQAISVL HEMMQQTFNL FSTKNSSAAW  
 DETLLEKFYIELFQQMNDLE  
 30 ACVIOEVGVE ETPLMNEDSI LAVKKYFQRI TLYLMEKKYS  
 PCAWEVVRAE IMRSLSFSTN  
 LQKRLRRKD

**Interferón alfa humano (subtipo 5):**

35 MALPFVLLMA LVVLNCKSIC SLGCDLPQTH SLSNRRTLMI  
 MAQMGRISPF SCLKDRHDFG

FPQEEFDGNQ FQKAQAISVL HEMIQQTFNL FSTKDSSATW  
 DETLLDKFYT ELYQQLNDLE  
 ACMMQEVGVE DTPLMNVDSILTVRKYFQRI TLYLTEKKYS  
 PCAWEVVRAE IMRSFSLSAN  
 5 LQERLRRKE

Para la obtención de los anticuerpos policlonales contra el interferón alfa humano es posible el uso de adyuvante y, por ejemplo, un fragmento polipéptido de interferón alfa humano, como el inmunógeno (antígeno) para la inmunización de los conejos.

Los anticuerpos policlonales contra el receptor CD8 se obtienen por el método arriba  
 10 indicado, usando como inmunógeno (antígeno) para la inmunización de los conejos un adyuvante y la molécula entera del receptor CD8 con la siguiente secuencia de aminoácidos:

1 MALPVTALLL PLALLLHAAR PSQFRVSPLD RTWNLGETVE  
 LKCQVLLSNP TSGCSWLFQP  
 15 61 RGAAASPTFL LYLSQNKPKA AEGLDTQRFS GKRLGDTFVL  
 TLSDFRRENE GYYFCSALSN  
 121 SIMYFSHFVP VFLPAKPTTT PAPRPPTPAP TIASQPLSLR  
 PEACRPAAGG AVHTRGLDFA  
 181 CDIIYIWAPLA GTCGVLLLSL VITLYCNHRN RRRVCKCPRP  
 20 VVKSGDKPSL SARYV.

Para la obtención de anticuerpos policlonales contra el receptor CD8 es posible el uso, como inmunógeno (antígeno) para la inmunización de los conejos, de un adyuvante y, por ejemplo, un fragmento polipéptido del receptor CD8 escogido de las siguientes secuencias:

25 11-30:  
 PLALLLHAAR PSQFRVSPLD;  
 81-100:  
 AEGLDTQRFS GKRLGDTFVL;  
 121-140:  
 30 SIMYFSHFVP VFLPAKPTTT;  
 201-210:  
 VITLYCNHRN;  
 221-235:

VVKSGDKPSL SARYV

Para la preparación del fármaco se usa preferentemente la mezcla de tres diluciones acuoso-alcohólicas de la solución matriz primaria de los anticuerpos diluidos en  $100^{12}$ ,  $100^{30}$  y  $100^{200}$  veces, respectivamente, lo que se corresponde con las diluciones centesimales C12, C30 y C200, preparadas por tecnología homeopática. Durante la realización del fármaco reivindicado en su forma sólida medicinal se lleva la mezcla de componentes indicados a un vehículo neutro.

La forma activada - potenciada de cada componente se prepara por medio de la reducción uniforme de la concentración como resultado de la dilución consecutiva de 1 parte de cada solución sometida a dilución, comenzando con la solución matriz mencionada, en 9 partes (para la dilución decimal D) o en 99 partes (para la dilución centesimal C) o en 999 partes (para la dilución milesimal M) del disolvente neutro en combinación de la agitación vertical repetida (potenciación, o "dinamización") de cada dilución obtenida y el uso de recipientes independientes para cada dilución consecutiva hasta obtener la potencia necesaria - multiplicidad de la dilución por el método homeopático (véase, por ejemplo, W. Schwabe "Homeopathic medicinal preparations", M, 1967, p. 14-29).

El tratamiento externo durante el proceso de reducción de la concentración también se puede realizar por ultrasonido, electromagnetismo o cualquier otra acción física.

Por ejemplo, para la preparación de la 12ª dilución centesimal C12, se diluye una parte de la solución matriz (primaria) de los anticuerpos, por ejemplo contra el factor de necrosis tumoral alfa con la concentración de 2,5 mg/ml en 99 partes de agua neutra o de un disolvente acuoso-alcohólico y se agita verticalmente repetidamente (10 y más veces) – se produce la potenciación, obteniéndose la primera dilución centesimal C1. De esta 1ª dilución centesimal C1 se prepara la 2ª dilución centesimal C2. Esta operación se repite 11 veces, obteniendo la 12ª dilución centesimal C12. Así, la 12ª dilución centesimal C12 es la solución obtenida por dilución consecutiva diluyendo una 1ª parte de la solución matriz primaria, que es la solución de anticuerpos contra el interferón gamma humano con la concentración de 2,5 mg/ml, en 99 partes de disolvente neutro 12 veces consecutivas en recipientes diferentes, es decir la solución obtenida por dilución de la solución matriz  $100^{12}$  veces. Se realizan operaciones análogas con la multiplicidad de diluciones correspondientes para obtener las diluciones C30 y C 50.

En el uso, por ejemplo, de la forma activada - potenciada de anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral - alfa en forma de mezcla de distintas diluciones, principalmente

centesimales, cada dilución (por ejemplo, C 12, C30, C50) se prepara individualmente por la tecnología descrita anteriormente hasta la dilución de 3 diluciones menos que la final (para la obtención de C9, C27, C47, respectivamente), y luego se lleva una parte de cada componente, de acuerdo a la composición de la mezcla, a un recipiente y se mezcla con  
5 la cantidad necesaria de disolvente (con 97 partes para la dilución centesimal, respectivamente). Luego la mezcla obtenida se diluye dos veces consecutivamente en la proporción de 1 a 100, potenciando la solución obtenida después de cada dilución. Con ello se obtiene la forma activada - potenciada de los anticuerpos, por ejemplo, contra el interferón gamma humano en dosis ultrabajas, obtenidas por la dilución de la solución  
10 matriz  $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{50}$  veces, lo que es equivalentes a la mezcla de las diluciones centesimales C12, C30, C50.

Es posible el uso de cada componente por separado en forma de mezcla de otras distintas diluciones, por ejemplo, decimales y/o centesimales, (D 20, C 30, C 100 ó C12, C30, C200, etc.), preparadas por tecnología homeopática, cuya eficacia se determina  
15 experimentalmente.

Para obtener la forma sólida de administración oral del fármaco reivindicado se realiza el proceso de irrigación en la instalación de lecho fluidizado (por ejemplo, del tipo de "Hüttlin Pilotlab" producido por la compañía Hüttlin GmbH) hasta la saturación de los gránulos de la sustancia neutra que son inyectados en el lecho pseudo-fluidizado hirviente; la  
20 sustancia es lactosa (el azúcar de la leche) con  $50 \div 500 \mu\text{m}$  de dimensión de las partículas, previamente obtenidas mediante la solución acuosa o acuoso-alcohólica de la forma activada - potenciada de los anticuerpos contra el receptor CD4, principalmente, en proporción de 1 kg de solución de anticuerpos en 5 ó 10 kg de lactosa (1:5 - 1:10) con  
25 secado simultáneo en el flujo de aire caliente suministrado bajo la rejilla a una temperatura no mayor de  $40^{\circ}\text{C}$ . La cantidad calculada de lactosa ( $10 \div 91\%$  de la masa del comprimido), saturada con la forma activada - potenciada de los anticuerpos por la metodología arriba indicada, se carga en el mezclador y se mezcla con la lactosa, humedecida con la forma activada - potenciada de los anticuerpos, en la cantidad de 3 -  
30  $10\%$  de la masa del comprimido y con la lactosa pura en cantidad no mayor al  $84\%$  de la masa del comprimido (para reducir los costes y simplificar y acelerar el proceso tecnológico sin reducir la eficacia medicinal). Luego, se añade a la mezcla la celulosa microcristalina en la cantidad de  $5 \div 10\%$  de la masa del comprimido y el estearato de  
35 magnesio en la cantidad de  $1\%$  de la masa del comprimido. La masa de comprimido obtenida es mezclada uniformemente y comprimida por compresión directa en seco (por ejemplo, en la comprimidora Korsch - XL 400). Después de la formación de comprimidos

se obtienen comprimidos de 300 mg de masa saturados de la solución acuoso-alcohólica de la forma activada - potenciada de los anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral alfa en dosis ultrabajas de cada componente preparadas a partir de la solución matriz, diluida  $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{50}$  veces, lo que es equivalente a la mezcla de las diluciones centesimales C12, C30 y C50, preparadas según la tecnología homeopática.

Se recomienda ingerir preferentemente de 1-2 comprimidos del fármaco reivindicado 2-4 veces al día.

Ejemplo 1.

La acción antirretroviral del fármaco reivindicado fue estudiada, inhibiendo la replicación del VIH en el cultivo de las células mononucleares de sangre periférica humana, infectadas *in vitro* con la cepa VIH-1-LAI. La eficacia de la inhibición de la replicación del VIH fue valorada por el contenido de la proteína básica de la nucleocápsida del VIH p24 en los sobrenadantes.

Para la realización de los estudios experimentales fueron usados los anticuerpos policlonales de conejo anti-factor de necrosis tumoral alfa purificados por afinidad, preparados por encargo por una empresa biotecnológica especializada, que fueron la base para preparar la forma activada - potenciada de las diluciones acuosas de anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral alfa en la dosis ultrabaja, obtenidas utilizando la tecnología homeopática mediante la superdilución de la solución matriz primaria (concentración de 2,5 mg/ml)  $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{50}$  veces, lo que es equivalente a la mezcla de las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C50 (en adelante: DUB AC anti-TNF alfa). La valoración de la actividad antivírica del complejo preparado se realizó con el uso de las células mononucleares de sangre periférica humana que fueron infectadas *in vitro* con la cepa VIH-1-LAI.

Las células mononucleares de sangre periférica humana fueron aisladas de la sangre de un donante sano seronegativo por centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Las células se estimularon durante 3 días con el uso de  $1 \mu\text{g/ml}$  de fitohemaglutinina P y  $5 \text{ UI/ml}$  de interleuquina humana recombinante.

A fin de evaluar la actividad antirretroviral, las preparaciones se colocaron en un pocillo que contenía  $100 \mu\text{l}$  de células mononucleares activadas de sangre periférica humana, o bien 24 horas antes o 15 minutos después de la infección de las células con la cepa VIH-1-LAI a una dosis de 100 TCID<sub>50</sub> ( $50 \mu\text{l}$  de inóculo de la cepa VIH-1-LAI). Antes de colocarlo en el pocillo, la DUB AC anti-TNF-alfa ( $12,5 \mu\text{l}$ ) o azidotimidina (sustancia activa

– zidovudina) a una concentración 1000 nM (la preparación control) se mezclaron con el medio RPMI1640 (DIFCO) hasta alcanzar el volumen final de 50 µl.

Los sobrenadantes de los cultivos celulares se recogieron en el día 7 después de la infección de las células. La eficacia de los productos se definió a partir de la inhibición de la replicación del VIH, que fue evaluada por el contenido de la proteína básica de la nucleocápsida del VIH p24 en los sobrenadantes de las células utilizando el método de ELISA (kit de ELISA Retrotek).

Se ha visto que la DUB AC anti-TNF-alfa inhibe la replicación del VIH en  $92 \pm 3\%$  cuando se añade al recipiente 24 horas antes, y en  $13 \pm 13\%$  cuando se añade al recipiente 15 minutos después de la infección de las células con la cepa VIH-1-LAI, respectivamente. La azidotimidina en la dosis de 1000 nM inhibió la replicación del VIH en  $99 \pm 0$  y  $99 \pm 1\%$ , respectivamente, cuando se añadió 24 horas antes y 15 minutos después de la infección de las células con la cepa VIH-1-LAI.

Así, el estudio *in vitro* ha mostrado la alta actividad antirretroviral del preparado reivindicado en base a la forma activada - potenciada de los anticuerpos policlonales de conejo contra el TNF alfa.

Nota: TCID<sub>50</sub> es la dosis que infecta el 50% de las células del cultivo de tejido.

#### Ejemplo 2.

La acción antirretroviral del fármaco reivindicado fue estudiada, inhibiendo la replicación del VIH en el cultivo de las células mononucleares de sangre periférica humana, infectadas *in vitro* con la cepa VIH-1-LAI. La eficacia de la inhibición de la replicación del VIH fue valorada por el contenido de la proteína básica de la nucleocápsida del VIH p24 en los sobrenadantes.

Para la realización de los estudios experimentales fueron usados los anticuerpos policlonales de conejo contra el CD8 purificados por afinidad, preparados por encargo por una empresa biotecnológica especializada, que fueron la base para preparar la forma activada - potenciada de las diluciones acuosas de anticuerpos contra el CD8 en dosis ultrabaja, obtenidas utilizando la tecnología homeopática mediante la superdilución de la solución matriz primaria (concentración de 2,5 mg/ml)  $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{50}$  veces, lo que es equivalente a la mezcla de las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C50 (en adelante: DUB AC CD8).

La valoración de la actividad antivírica del complejo preparado se realizó con el uso de

las células mononucleares de sangre periférica humana que fueron infectadas *in vitro* con la cepa VIH-1-LAI. Las células mononucleares de sangre periférica humana fueron aisladas de la sangre de un donante sano seronegativo por centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Las células se estimularon durante 3 días con el uso de 1 µg/ml de fitohemaglutinina P y 5 UI/ml de interleuquina-2 humana recombinante.

A fin de evaluar la actividad antirretroviral, las preparaciones se colocaron en un pocillo que contenía 100 µl de células mononucleares activadas de sangre periférica humana, o bien 24 horas antes o 15 minutos después de la infección de las células con la cepa VIH-1-LAI a una dosis de 100 TCID<sub>50</sub> (50 µl de inóculo de la cepa VIH-1-LAI). Antes de colocarlo en el pocillo, la DUB AC CD8 (12,5 µl) o azidotimidina (sustancia activa – zidovudina) a una concentración 1000 nM (la preparación control) se mezclaron con el medio RPMI1640 (DIFCO) hasta alcanzar el volumen final de 50 µl.

Los sobrenadantes de los cultivos celulares se recogieron en el día 7 después de la infección de las células. La eficacia de los productos se definió a partir de la inhibición de la replicación del VIH, que fue evaluada por el contenido de la proteína básica de la nucleocápsida del VIH p24 en los sobrenadantes de las células utilizando el método de ELISA (kit de ELISA Retrotek).

Se ha mostrado que la DUB AC CD8 inhibe la replicación del VIH en 87 ± 11% cuando se añade al recipiente 24 horas antes, y en 40 ± 4% cuando se añade al recipiente 15 minutos después de la infección de las células con la cepa VIH-1-LAI, respectivamente. La azidotimidina en la dosis de 1000 nM inhibió la replicación del VIH en 99 ± 0 y 99 ± 1%, respectivamente, cuando se añadió 24 horas antes y 15 minutos después de la infección de las células con la cepa VIH-1-LAI.

Así, el estudio *in vitro* ha mostrado una alta actividad antirretroviral de las dosis ultrabajas de los anticuerpos policlonales de conejo contra el CD8.

Nota: TCID<sub>50</sub> - dosis que infecta el 50% de las células del cultivo de tejido.

### Ejemplo 3

La actividad antirretroviral de las formas activadas-potencias de las diluciones acuosas de anticuerpos policlonales de conejo purificados por afinidad dirigidos contra el interferón alfa en dosis ultrabajas (DUB), obtenidas utilizando la tecnología homeopática mediante la superdilución de la solución matriz primaria (concentración de 2,5 mg/ml) 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup>, 100<sup>50</sup> veces, lo que es equivalente a la mezcla de las diluciones homeopáticas



centesimales C12, C30, C50 (en adelante: DUB AC anti-IFN- $\alpha$ ) se evaluó con el uso de las células mononucleares de sangre periférica humana que fueron infectadas *in vitro* con la cepa VIH-1-LAI. Como preparación control se usó azidotimidina.

5 Las células mononucleares de sangre periférica humana fueron aisladas de la sangre de un donante sano seronegativo por centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Las células se estimularon durante 3 días con el uso de 1  $\mu$ g/ml de fitohemaglutinina P y 5 UI/ml de interleuquina-2 humana recombinante.

10 Las células se infectaron con la cepa del VIH-1-LAI, colocando 50  $\mu$ l de inóculo de la cepa del VIH-1-LAI que corresponden a una dosis de 100 TCID<sub>50</sub> (dosis que infecta 50% de las células del cultivo de tejido).

15 A fin de evaluar la actividad antirretroviral, la preparación DUB AC anti-IFN- $\alpha$  y la preparación control de azidotimidina se colocaron en un pocillo que contenía 100  $\mu$ l de células mononucleares activadas de sangre periférica humana, o bien 24 horas antes o 15 minutos después de la infección de las células con la cepa VIH-1-LAI. Antes de colocarla en el pocillo, la preparación de DUB AC anti-IFN- $\alpha$  (12,5  $\mu$ l) y la preparación de azidotimidina a una concentración 1000 nM se mezclaron con el medio RPMI1640 (DIFCO) hasta alcanzar el volumen final de 50  $\mu$ l.

20 Los sobrenadantes de los cultivos celulares se recogieron en el día 7 después de la infección. La eficacia de las preparaciones se definió a partir de la inhibición de la replicación del VIH, que fue evaluada por el contenido de la proteína básica de la nucleocápsida del VIH p24 en los sobrenadantes de las células utilizando el método de ELISA (kit de ELISA Retrotek).

25 Se ha mostrado que la DUB AC anti-IFN- $\alpha$  inhibe la replicación del VIH en  $95 \pm 2\%$  cuando se añade al recipiente 24 horas antes, y en  $59 \pm 14\%$  cuando se añade al recipiente 15 minutos después de la infección de las células con la cepa VIH-1-LAI, respectivamente. La azidotimidina en la dosis de 1000 nM inhibió la replicación del VIH en  $99 \pm 0$  y  $99 \pm 1\%$ , respectivamente, cuando se añadió 24 horas antes y 15 minutos después de la infección de las células con la cepa VIH-1-LAI.

30 Así, el estudio *in vitro* ha mostrado la alta actividad antirretroviral de la preparación DUB AC anti-IFN- $\alpha$ ..

## REIVINDICACIONES

1. Un fármaco caracterizado por que contiene la forma activada - potenciada de anticuerpos contra una proteína o péptido del sistema inmune que interactúa con el VIH o cuyo contenido y/o actividad funcional cambia debido a la infección del VIH, que es el factor de necrosis tumoral alfa.  
5
2. El fármaco según la reivindicación 1, caracterizado por que está en forma sólida de composición farmacéutica, la cual contiene una cantidad tecnológicamente necesaria de vehículo neutro saturado con la mezcla de soluciones acuosas o acuoso-alcohólicas de la forma activada - potenciada de los anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral alfa, y excipientes farmacéuticos aceptables.  
10
3. El fármaco según la reivindicación 2, caracterizado por que entre los excipientes farmacéuticos aceptables se incluye la lactosa, la celulosa microcristalina y el estearato de magnesio.
4. Un método para la preparación de un fármaco según la reivindicación 1, caracterizado por que la forma activada – potenciada de los anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral alfa, se prepara en forma de solución acuosa o acuoso-alcohólica activada-potenciada, cuya actividad se obtiene por el proceso de dilución múltiple consecutiva de la solución matriz inicial de los anticuerpos en un disolvente acuoso o acuoso-alcohólico en combinación con la acción mecánica externa de agitación vertical de cada dilución.  
15  
20
5. El método según la reivindicación 4, caracterizado por que las soluciones acuosas o acuoso-alcohólicas de las formas activadas - potenciadas de los anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral alfa son obtenidas por medio de la dilución múltiple consecutiva de la solución matriz inicial de anticuerpos, en combinación con el impacto mecánico externo de agitación vertical después de cada dilución, donde la concentración de la solución matriz es de 0,5 - 5,0 mg/ml.  
25
6. El método según la reivindicación 5, caracterizado por que las soluciones acuosas o acuoso-alcohólicas de las formas activadas - potenciadas de los anticuerpos se preparan como mezcla de diluciones distintas, principalmente centesimales, preparadas por tecnología homeopática.  
30
7. Uso de un fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para preparar un medicamento destinado a la prevención de la infección del VIH y al tratamiento de las enfermedades causadas por el VIH, incluido el SIDA.