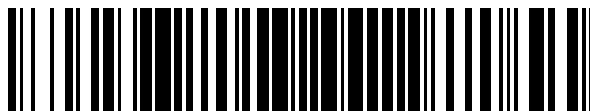


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 897**

21 Número de solicitud: 201590109

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

18.03.2014

30 Prioridad:

18.03.2013 RU 2013111961

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.02.2016

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: **Método para la determinación de la intensidad de la actividad de modificación de los medicamentos bipáticos**

57 Resumen:

Método para la determinación de la intensidad de la actividad de modificación de los medicamentos bipáticos.

La presente invención comprende un método para determinar el grado de potencia modificada de un medicamento bipático que comprende un componente terapéutico y un componente homeopático, caracterizado porque el componente homeopático tiene algún efecto físico, químico o biológico sobre el componente terapéutico y/o la eficacia farmacológica del mismo. Una medición analítica de al menos un parámetro característico de la forma terapéutica se lleva a cabo antes de su interacción con la forma activada-potenciada; la misma medición(es) analítica se llevan a cabo después de la interacción entre las formas terapéutica y activada-potenciada. Estos datos se utilizan para confirmar cualquier potencia modificada producida por la presencia de la forma molecular en la forma activada-potenciada y para cuantificar el grado de potencia modificadora asociada con la forma activada-potenciada en unidades relativas adimensionales de actividad (actividad de liberación).

Tabla. Superposición de espectros de Ab para IFN-gamma + AC y Ab para IFN-gamma + placebo (*)

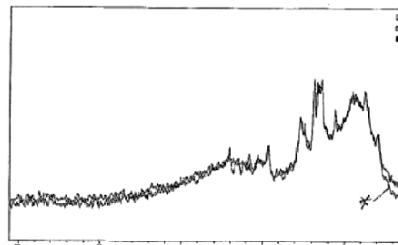


Figura 1

DESCRIPCIÓN

Método para la determinación de la intensidad de la actividad de modificación de los medicamentos bipáticos

5

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Rusa No. 2013111961, presentada el 18 de Marzo de 2013, la cual se incorpora en la presente como referencia en su integridad.

10 **Campo**

La presente invención se relaciona con el campo de la medicina, específicamente con el campo farmacéutico. La invención se utiliza para determinar la potencia modificada de drogas, especialmente las drogas bipáticas, en por lo menos un componente de las mismas que se prepara de acuerdo con las técnicas homeopáticas, de una manera confiable y reproducible.

15

Antecedentes

Forma activada-potenciada

Los medicamentos preparados de acuerdo con las técnicas homeopáticas incluyen aquéllos que se preparan mediante potenciación homeopática, también referida como activación, a través de múltiples diluciones consecutivas en un portador (agua o solvente de agua-alcohol) – por consiguiente disminuyendo la concentración – en combinación con la agitación de cada dilución consecutiva. Ver, por ejemplo, RU 2191601 C1; RU 2192888 C1; RU 2332236 C1 (versión en Inglés encontrada en la EP 2 123 300); y RU 2438707 C2 (Publicación de Patente E.U.A. 2011/0008452). El resultado de la preparación mediante potenciación homeopática es un medicamento que contiene dosis bajas o muy bajas del medicamento inicial; la dilución puede continuar para acercarse o exceder 1 mol de portador por molécula del medicamento inicial en la forma molecular, teniendo presente que el número total de moléculas por mol es dado por el número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

El término forma molecular se define más adelante. En el contexto de un sólido, la dilución es referida como trituración. A través de las técnicas homeopáticas el portador puede obtener potencia modificadora, la cual se manifiesta en su habilidad para alterar las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la sustancia de arranque cuando es tratada por dicha forma activada-potenciada (RU 2161955 C1).

35

El término “forma molecular” se utiliza para denotar una o más moléculas de una sustancia química particular. De este modo, la forma molecular de la aspirina puede ser una única molécula de ácido acetilsalicílico; 1 mol de aspirina en forma molecular consiste de $6,022 \times 10^{23}$ moléculas de ácido acetilsalicílico y pesa 180,157 gramos.

5

El término “forma activada-potenciada” se utiliza para denotar un producto de potenciación homeopática de una solución inicial que contiene una forma molecular de una sustancia. En otras palabras, una solución conteniendo la forma molecular de una sustancia, por ejemplo, un anticuerpo o molécula orgánica específica, es sometida a dilución consecutiva repetida y a múltiples sacudidas verticales de cada solución obtenida de acuerdo con las técnicas homeopáticas. El diluyente preferido, a menudo denominado el portador, es agua o una mezcla de agua-alcohol etílico. La concentración preferida de la forma molecular en el portador inicial está en un rango desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5,0 mg/ml. La forma activada-potenciada se puede preparar a partir de una solución inicial por medio de potenciación homeopática, preferiblemente utilizando el método de disminución de la concentración proporcional mediante dilución en serie de 1 parte de cada solución precedente. De este modo, 1 parte de la solución inicial se mezcla con 99 partes (para la dilución centesimal) del portador y sometida a impacto externo. Preferiblemente, el impacto externo involucra múltiples sacudidas verticales (dinamización) de cada dilución. Esto resulta en la creación de la 1ra dilución centesimal, denotada C1. La 2da dilución centesimal (C2) es preparada mezclando 1 parte de la 1ra dilución centesimal C1 con 99 partes del portador. Este procedimiento se repite 10 veces más para preparar la 12da dilución centesimal C12. Por lo general se utilizan recipientes separados para cada dilución subsiguiente hasta el factor de dilución requerido. Procedimientos similares con el factor de dilución pertinente se llevan a cabo para obtener, por ejemplo, diluciones C30, C50 y C200. Este método es bien aceptado en el arte de la homeopatía. Ver, por ejemplo, V. Schwabe “Homeopathic medicines”, M., 1967, p. 14-29, incorporada en la presente como referencia para los propósitos establecidos. C12, C30, y C200 representan diluciones de la solución de matriz primaria (tintura madre) de los anticuerpos 100^{12} , 100^{30} y 100^{200} veces, respectivamente.

30

Las formas activadas potenciadas preferidas a menudo son una mezcla de diversas diluciones centesimales de la misma forma molecular. Por ejemplo, una mezcla de diluciones C12, C30, y C50 o diluciones C12, C30 y C200. Cuando se utiliza la mezcla de varias diluciones homeopáticas, cada componente de la composición, por ejemplo, C12, C30, C50, C200, se prepara de forma separada de acuerdo con el procedimiento descrito

35

líneas antes hasta que se obtiene la penúltima dilución, es decir, hasta C11, C29 y C199 respectivamente, y luego una parte de cada componente es agregada en un recipiente de acuerdo con la composición de la mezcla y se mezcla con la cantidad requerida del portador, es decir, 97 partes por dilución centesimal.

5

Los ejemplos de potenciación homeopática se describen en las patentes E.U.A. Nos. 7.572.441 y 7.582.294, las cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad y para los propósitos establecidos. El término "forma activada-potenciada" y el término "dosis ultra baja" están concebidos completamente como de apoyo y principalmente son sinónimos uno del otro.

10

Bipatía homeopática

La patente E.U.A. No. 8.178.498 describe el concepto de formas medicinales bipáticas. Las preparaciones medicinales bipáticas combinan los valores terapéuticos de una sustancia medicinal en dosis terapéutica y una preparación activada-potenciada químicamente homogénea con la sustancia medicinal pero diferente en el mecanismo de acción en el organismo. En otras palabras, la preparación medicinal bipática descrita combina la forma molecular de una sustancia medicinal en aproximadamente su concentración estándar y una forma activada-potenciada que se deriva de la misma forma molecular pero que tiene su forma molecular presente, si acaso, en concentraciones muy bajas. La dosis estándar y la forma activada-potenciada, ya sea combinadas o administradas aproximadamente de forma simultánea, muestran que promueven la activación biológica e inducen cambios morfológicos y funcionales positivos en la forma de "adaptación sistémica" responsable de la eficiencia terapéutica incrementada de la sustancia medicinal activa con riesgo reducido de las reacciones individuales en los pacientes y los efectos secundarios o efectos posteriores adversos no deseados.

15

20

25

Es más, la administración simultánea "bipática" de la sustancia medicinal en dosis terapéutica y forma activada-potenciada, de acuerdo con la patente E.U.A. No. 8.178.498: (1) permite dosis convencionales menores de la sustancia, (2) evita la habituación debido a la "inducción" enzimática, y (3) evita la sobredosis debido a la neutralización de las energías negativas y estimulación de ciertos órganos y de la totalidad. La patente E.U.A. No. 8.178.498 se incorpora en la presente en su totalidad como referencia y para los propósitos establecidos.

30

35

Valoración cualitativa/cuantitativa de los medicamentos

Como se conoce en el arte, por ejemplo, la RU 2181890 C1, es un método para determinar la actividad biológica de una sustancia. La actividad es representada por una relación entre la tasa de respuesta enzimática a una muestra de prueba antes y después de agregar la sustancia. Una "concentración de sustancia óptima en una muestra" es determinada *in vitro*.

5 Sin embargo, este método no es adecuado para determinar la potencia de los medicamentos preparados de acuerdo con las técnicas homeopáticas.

Como se conoce en el arte, es el método para la determinación de la potencia homeopática del medicamento mediante la aplicación de radiación óptica coherente linealmente polarizada a un medicamento activado presente en un campo magnético constante. La radiación transmitida difusa es medida utilizando la acumulación relacionada al tiempo de los valores de su intensidad de componente polarizado en el modo de desviación óptica desde diferentes puntos del medio de prueba. El análisis es realizado para calcular el espectro de frecuencias de fluctuaciones muy bajas de la intensidad transmitida y los datos son comparados con un espécimen estándar. Ver, por ejemplo, la RU 2112976 C1.

También se conoce el método para la determinación cualitativa de la medicina homeopática o la forma activada-potenciada. El método incluye el tratamiento de un medio para la prueba con un espécimen estándar y el registro de las alteraciones de los parámetros físicos y químicos. Se utiliza un conjunto de sustancias conocidas cuya estructura y/o composición son aproximadamente similares o similares a aquéllas de la medicina homeopática determinada o a aquéllas de la forma de sustancia potenciada así como también la estructura y/o composición de los anticuerpos para estas sustancias conocidas. La identificación de la medicina homeopática o forma de sustancia potenciada se basará en la sustancia conocida, cuya reacción con el anticuerpo apropiado cuando se introduce la medicina homeopática o forma de sustancia potenciada en el medio de reacción está acompañada por alteraciones que se registran utilizando los métodos analíticos inmunoquímicos que se basan en la reacción antígeno-anticuerpo (RU 2195648 C2).

30 Los métodos del arte anterior, sin embargo, no proveen determinación cualitativa y cuantitativa confiable y reproducible de la identidad y potencia de la droga asociada con una forma activada-potenciada. Esto incluye medicamentos activados preparados de acuerdo con las técnicas homeopáticas que se describen líneas antes.

35 **Resumen de la invención**

Un método para determinar la actividad de la forma activada-potenciada de una sustancia, dicho método comprendiendo: proveer una forma activada-potenciada de una sustancia, asegurar la ausencia de la forma molecular de la sustancia en dicha forma activada-potenciada, proveer una forma molecular de dicha sustancia, medir por lo menos un
5 parámetro físico, químico o biológico (A) de dicha forma molecular de dicha sustancia utilizando un método analítico adecuado, tratar dicha forma molecular de dicha sustancia con dicha forma activada-potenciada de dicha sustancia, y medir dicho por lo menos un parámetro físico, químico o biológico (Am) de dicha forma molecular tratada de dicha
10 sustancia utilizando dicho método analítico, en donde dicha actividad de dicha forma activada-potenciada de dicha sustancia es el grado de diferencia entre A y Am.

El método descrito líneas antes, comprendiendo además expresar dicha actividad de dicha forma activada-potenciada de dicha sustancia en unidades relativas (X) de acuerdo con la fórmula $X=C(A-A_M)/A$.

15 El método descrito líneas antes, comprendiendo además i) tratar una forma molecular de una sustancia diferente con dicha forma activada-potenciada de la primera sustancia, ii) medir dicho por lo menos un parámetro físico, químico o biológico (B) de dicha forma molecular de dicha sustancia diferente con dicho método analítico, iii) medir dicho por lo
20 menos un parámetro físico, químico o biológico (Bm) de dicha forma molecular tratada de dicha sustancia diferente utilizando dicho método analítico para determinar la especificidad de dicho método, en donde dicho método es considerado específico cuando dicho por lo menos un parámetro físico, químico o biológico cambia de manera estadísticamente significativa para A-Am y no cambia de manera estadísticamente significativa para B-Bm.

25 El método descrito líneas antes, en donde dicho método analítico es Cromatografía Líquida de Alto Desempeño.

El método descrito líneas antes, en donde dicho método analítico es análisis inmunoenzimático.

30 El método descrito líneas antes, en donde dicho método analítico es Resonancia Magnética Nuclear.

El método descrito líneas antes, en donde dicha etapa de asegurar la ausencia de la forma
35 molecular de la sustancia comprende la retirada de la forma molecular de dicha sustancia.

El método descrito líneas antes, en donde dicha sustancia es un anticuerpo.

El método descrito líneas antes, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

- 5 El método descrito líneas antes, en donde dicha sustancia es una molécula orgánica pequeña.

El método descrito líneas antes, en donde dicha forma activada-potenciada es un líquido.

- 10 El método descrito líneas antes, en donde dicha forma activada-potenciada es impregnada en un portador sólido.

Breve descripción de las figuras

- 15 La Figura 1 muestra la superposición de los espectros de RMN de Ab para IFN-gamma + AC y Ab para IFN-gamma + agua purificada.

Descripción detallada de la invención

- 20 La presente invención es definida con referencia a las reivindicaciones anexas. Con respecto a las reivindicaciones, se han proporcionado definiciones pertinentes líneas antes y definiciones adicionales se proporcionan en este punto.

- 25 El término “anticuerpo” tal como se utiliza en la presente quiere decir una inmunoglobulina que específicamente se enlaza a, y es por consiguiente definida como complementaria con, una organización espacial y polar particular de otra molécula. Los anticuerpos tal como se señala en las reivindicaciones pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmento de la misma, puede ser natural, policlonal o monoclonal, y puede incluir varias clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de la misma pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab', y similares. El “anticuerpo” singular incluye el plural “anticuerpos”.

- 30 Los términos “forma activada-potenciada” o “forma potenciada”, se utilizan para denotar un producto de la potenciación homeopática de cualquier solución inicial conteniendo una forma molecular de una sustancia, por ejemplo, un anticuerpo. Los ejemplos de potenciación homeopática de anticuerpos se describen en las patentes E.U.A. Nos. 7.572.441 Y
35 7.582.294, las cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad y para el

propósito señalado. Un anticuerpo está en la forma “activada-potenciada” o “potenciada” cuando tres factores están presentes. Primero, la forma “activada-potenciada” del anticuerpo es un producto de un proceso de preparación bien aceptado en el arte de la homeopatía. Segundo, la forma “activada-potenciada” del anticuerpo debe tener actividad biológica determinada por métodos bien aceptados en la farmacología moderna. Tercero, la actividad biológica exhibida por la forma “activada-potenciada” del anticuerpo no puede ser explicada por la presencia de la forma molecular del anticuerpo en el producto final del proceso homeopático.

5

10 Ha habido una considerable cantidad de controversia con relación al tratamiento homeopático de los sujetos humanos. Mientras que la presente invención se apoya en procesos homeopáticos aceptados para obtener la forma “activada-potenciada” de una sustancia, es decir, forma molecular, no se basa solamente en la homeopatía en los sujetos humanos para evidencia de la actividad. En particular a las formas moleculares que consisten de anticuerpos, ha sido sorprendentemente descubierto por el inventor de la presente solicitud y ampliamente demostrado en los modelos farmacológicos aceptados que el solvente finalmente obtenido de la dilución múltiple consecutiva de una forma molecular de arranque de un anticuerpo tiene actividad definitiva no relacionada con la presencia de las trazas de la forma molecular del anticuerpo en la dilución objetivo. También, la forma

15

20 “activada-potenciada” reivindicada del anticuerpo abarca solamente soluciones o preparaciones sólidas cuya actividad biológica no puede ser explicada por la presencia de la forma molecular del anticuerpo remanente de la solución de arranque, inicial. En otras palabras, mientras que se contempla que la forma “activada-potenciada” del anticuerpo puede contener trazas de la forma molecular inicial del anticuerpo, una persona experta en el arte no puede atribuir la actividad biológica observada en los modelos farmacológicos aceptados a la forma molecular remanente del anticuerpo con algún grado de plausibilidad debido a las concentraciones extremadamente bajas de la forma molecular del anticuerpo remanente después de las diluciones consecutivas. Mientras que 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 del anticuerpo. Se prefiere la forma “activada-potenciada” del anticuerpo en un portador líquido o sólido en el cual la concentración de la forma molecular del anticuerpo está por debajo del límite de detección de las técnicas analíticas aceptadas, tal como electroforesis capilar y Cromatografía Líquida de Alto Desempeño. Particularmente preferida es la forma “activada-potenciada” del anticuerpo en forma líquida o sólida en la

25

30

35

cual la concentración de la forma molecular del anticuerpo está por debajo del Número de

Avogadro, es decir, 1 molécula de la forma molecular por $6,022 \times 10^{23}$ moléculas de portador.

La composición farmacéutica de la invención expande el arsenal de preparaciones disponibles para el tratamiento de profilaxis de las enfermedades infecciosas, incluyendo
5 infecciones bacterianas e infecciones virales agudas y crónicas.

La composición farmacéutica de combinación de acuerdo con este aspecto de la invención puede estar en forma líquida o en forma sólida. El procedimiento preferido para la preparación del componente activado-potenciado de la droga de combinación de acuerdo
10 con la presente invención es el uso de la mezcla de tres diluciones acuosas-alcohólicas de la solución de matriz primaria de los anticuerpos diluidos 100^{12} , 100^{30} y 100^{50} veces, respectivamente, que es equivalente a las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, y C50 o diluidas 100^{12} , 100^{30} y 100^{200} veces, respectivamente, que es equivalente a las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30 y C200. Para preparar una forma de
15 dosificación sólida, un portador sólido es tratado con la dilución deseada obtenida mediante el proceso homeopático. Para obtener una forma de dosificación unitaria sólida de la combinación de la invención, la masa del portador es impregnada con cada una de las diluciones. Ambos órdenes de impregnación son adecuados para preparar la forma de dosificación de la combinación deseada.

20 En el caso de que la forma activada-potenciada incluida en la composición farmacéutica sea preparada a partir de una forma molecular inicial del anticuerpo, es realizada de este modo en un proceso aceptado en el arte de la homeopatía. Los anticuerpos de arranque pueden ser monoclonales o anticuerpos policlonales preparados de acuerdo con procesos conocidos, por ejemplo, tal como se describe en Immunotechniques, G. Frimel, M.,
25 "Meditsyna", 1987, p. 9-33; "Hum. Antibodies. Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after" por Laffly E., Sodoyer R. – 2005 – Volumen 14. – N 1-2. P.33-55, ambos incorporados en la presente como referencia.

30 Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener, por ejemplo, por medio de la tecnología de hibridomas. La etapa inicial del proceso incluye la inmunización basada en los principios ya desarrollados en el curso de la preparación de antisueros policlonales. Etapas adicionales de trabajo involucran la producción de células híbridas generando clones de anticuerpos con especificidad idéntica. Su aislamiento separado se lleva a cabo utilizando
35 los mismos métodos tal como en el caso de la preparación de antisueros policlonales.

Los anticuerpos policlonales pueden ser obtenidos mediante la inmunización activa de los animales. Para este propósito, por ejemplo, animales adecuados (por ejemplo, conejos) reciben una serie de inyecciones del antígeno apropiado (citocina y receptor). El sistema inmune de los animales genera los anticuerpos correspondientes, que son recolectados de los animales de una manera conocida. Este procedimiento permite la preparación de un suero rico en anticuerpos monoespecíficos.

Si se desea, el suero conteniendo anticuerpos puede ser purificado, por ejemplo utilizando cromatografía afín, fraccionamiento por precipitación de la sal, o cromatografía de intercambio iónico. El suero enriquecido con anticuerpos purificado, resultante, puede ser utilizado como un material de arranque para la preparación de la forma activada-potenciada de los anticuerpos. La concentración preferida de la solución inicial resultante de anticuerpo en el solvente, preferiblemente agua o una mezcla de agua-alcohol etílico, está en un rango desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5,0 mg/ml.

Un procedimiento ejemplar para la preparación de una forma molecular consistente de anticuerpos policlonales para receptor CD4 puede ser descrita como sigue. En 7-9 días antes de tomar la muestra de sangre, se realizan de 1-3 inyecciones intravenosas del antígeno deseado a los conejos para incrementar el nivel de anticuerpos policlonales en la corriente sanguínea del conejo. Luego de la inmunización, se toman las muestras de sangre para probar el nivel del anticuerpo. Por lo general, el nivel máximo de reacción inmune del antígeno soluble es alcanzado dentro de los 40 a 60 días después de la primera inyección del antígeno. Luego de la completación del primer ciclo de inmunización, los conejos tienen un periodo de rehabilitación de 30 días, después del cual se realiza la re-inmunización con otras 1-3 inyecciones intravenosas. Para obtener el antisuero que contiene los anticuerpos deseados, la sangre inmunizada del conejo es recolectada de los conejos y colocada en un tubo de centrifugación de 50 ml. Los coágulos del producto formados en los lados del tubo son removidos con una espátula de madera, y se coloca una varilla en el coágulo en el centro del tubo. La sangre es luego colocada en un refrigerador por una noche a la temperatura de aproximadamente 40 °C. Al día siguiente, el coágulo en la espátula es removido, y el líquido remanente es centrifugado por 10 min a 13.000 rotaciones por minuto. El fluido sobrenadante es el antisuero objetivo. El antisuero obtenido es por lo general amarillo. Se agrega 20% de NaN_3 (concentración en peso) en el antisuero para una concentración final de 0,02% y de almacena antes de su uso en estado congelado a la temperatura de -20°C o sin NaN_3 a la temperatura de -70°C. Para separar los anticuerpos

objetivo a interferón gamma del antisuero, la siguiente secuencia de absorción de fase sólida es adecuada:

5 - 10 ml del antisuero de los conejos es diluido dos veces con 0,15 M de NaCl, después de lo cual se agrega 6,26g de Na₂SO₄, se mezcla e incuba por 12-16 horas a 4 °C. El sedimento es removido por medio de centrifugación, diluido en 10 ml de solución tampón de fosfato y dializado contra la misma solución tampón durante una noche a temperatura ambiente. Después que el sedimento es removido, la solución es aplicada a una columna DEAE-celulosa balanceada por medio de la solución tampón de fosfato. La fracción de anticuerpo es determinada midiendo la densidad óptica del eluato a 280 nm.

15 - Los anticuerpos crudos aislados son purificados utilizando el método de cromatografía afín uniendo los anticuerpos obtenidos al antígeno CD4 localizado en la matriz insoluble de los medios de cromatografía, con elución posterior por medio de soluciones acuosas de sal concentradas.

20 - La solución tampón resultante es utilizada como la solución inicial para el proceso de dilución homeopática que se utiliza para preparar la forma activada-potenciada de los anticuerpos. La concentración preferida de la solución de matriz inicial de los anticuerpos de conejo policlonales de antígeno purificado para receptor CD4 es de 0,5 a 5,0 mg/ml, preferiblemente, 2,0 a 3,0 mg/ml.

25 Preferiblemente, la composición farmacéutica en la forma de dosificación unitaria sólida se prepara a partir de gránulos del portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico que fue previamente saturado con las diluciones acuosas o acuosas-alcohólicas de la forma activada-potenciada de receptor CD4 de anticuerpos. La forma de dosificación sólida puede estar en cualquier forma conocida en el arte de farmacéutico, incluyendo una tableta, una cápsula, un comprimido y otros. Como un ingrediente farmacéutico inactivo se puede utilizar glucosa, sucrosa, maltosa, almidón, isomaltosa, isomalta y otros mono-, oligo- y poli-
30 sacáridos que se utilizan en la elaboración de productos farmacéuticos así como también mezclas tecnológicas de los ingredientes farmacéuticos inactivos antes mencionados con otros excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico, por ejemplo isomalta, crospovidona, ciclamato de sodio, sacarina sódica, ácido cítrico anhidro, etc.), incluyendo lubricantes, desintegrantes, aglutinantes y agentes de coloración. Los portadores preferidos
35 son lactosa e isomalta. La forma de dosificación farmacéutica puede incluir además

excipientes farmacéuticos estándares, por ejemplo, celulosa microcristalina, estearato de magnesio y ácido cítrico.

5 Para preparar la forma sólida oral, de 100 a 300 μm de gránulos de lactosa son impregnados con las soluciones acuosas o acuosas-alcohólicas de la forma activada-potenciada de los anticuerpos para el receptor CD4 en la relación de 1 kg de solución de anticuerpo a 5 ó 10 kg de lactosa (1:5 a 1:10). Para realizar la impregnación, los gránulos de lactosa son expuestos a irrigación por saturación en el lecho bullente fluidificado en una planta de lecho en ebullición (por ejemplo, "Hüttlin Pilotlab" por Hüttlin GmbH) con secado posterior por medio de flujo de aire calentado a una temperatura por debajo de 40 °C. La cantidad estimada de los gránulos secados (10 a 34 partes en peso) saturados con la forma activada-potenciada de los anticuerpos es colocada en el mezclador, y mezclada con 25 a 45 partes en peso de lactosa pura "no saturada" (que se utiliza para los propósitos de reducción de costos así como de simplificación y aceleración del proceso tecnológico sin disminución de 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 la tableta obtenida es mezclada de forma uniforme, y formada en tabletas por medio de prensado en seco directo (por ejemplo, en una prensa para tabletas Korsch – XL 400) para formar de 150 a 500 mg de píldoras redondas, preferiblemente, 300 mg. Después de la formación en 20 tabletas, se obtienen 300 mg de píldoras que son saturadas con la solución acuosa-alcohólica (3,0-6,0 mg/píldora) de la forma activada-potenciada de los anticuerpos para el receptor CD4 en forma de una mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, y C50 o una mezcla de diluciones homeopáticas centesimales C12, C30 y C200.

25 Preferiblemente, para el propósito de tratamiento, la combinación de la invención es administrada desde una vez al día hasta cuatro veces al día, preferiblemente dos veces al día, cada administración incluyendo una o dos formas de combinación de dosificación unitaria.

30 El resultado tecnológico que busca la invención reivindicada es la confiabilidad y reproducibilidad incrementadas de los métodos para identificar los medicamentos preparados de acuerdo con las técnicas homeopáticas, es decir, medicamentos que no contienen la forma molecular en ninguna concentración prácticamente detectable. Además, la invención reivindicada busca la confiabilidad y reproducibilidad incrementadas de los 35 métodos para determinar la potencia modificadora farmacológica asociada con un

medicamento, es decir, una forma activada-potenciada. Estos métodos se realizan *in vitro*, es decir, fuera del cuerpo.

5 Los métodos para alcanzar el resultado tecnológico de la presente invención en definitiva buscan determinar el grado de potencia modificadora asociada con la forma activada-potenciada que fue adquirida durante el proceso de activación. El procesamiento de la sustancia de arranque conteniendo la forma molecular para lograr un medicamento preparado por medio de las técnicas homeopáticas, es decir, la forma activada-potenciada, comprende diluciones consecutivas múltiples con un portador, disminuyendo de este modo
10 la concentración de la sustancia de arranque.

En el contexto de las preparaciones bipáticas medicinales, la potencia de la forma activada-potenciada se manifiesta en su habilidad para alterar o afectar las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la dosis terapéutica. Es decir, la invención reivindicada involucra
15 determinar las alteraciones en los parámetros físicos de la dosis terapéutica utilizando los métodos analíticos después de la adición de la forma activada-potenciada a la misma. Dichos métodos analíticos permitirán la determinación de la presencia o ausencia de la forma activada-potenciada en la dosis terapéutica. Los métodos analíticos miden uno o más parámetros físicos de la dosis terapéutica antes de y después de la mezcla con la forma
20 activada-potenciada. El grado de potencia de la dosis terapéutica antes de y después de la mezcla con la forma activada-potenciada puede también ser medido utilizando los métodos analíticos. Las alteraciones de un parámetro característico pueden ser provistas en unidades relativas.

25 La medición de un parámetro característico puede ser afectada por la presencia de la forma molecular a niveles detectables en la forma activada-potenciada. Si las moléculas de la forma molecular están presentes en niveles detectables en la forma activada-potenciada, entonces dichas moléculas necesitan ser retiradas de la forma activada-potenciada antes de mezclar la forma activada-potenciada y la dosis terapéutica. La ausencia de la forma
30 molecular en una muestra es, para los propósitos de la presente materia objeto, sinónimo con la incapacidad de detectar dicha forma molecular. Un medio para retirar/hacer no detectable una forma molecular de una forma activada-potenciada es a través de la dilución adicional, por ejemplo, dilución homeopática centesimal. Otro medio es a través de un tamiz molecular. Un tamiz molecular es un
35 material con muy pocos orificios de tamaño exacto y uniforme. Estos orificios son de tamaño suficientemente pequeño para bloquear las moléculas grandes a la vez que permite

que las moléculas pequeñas pasen. Los ejemplos de tamices moleculares incluyen carbón activado y gel de sílice. Similar a un tamiz molecular, cualquier procedimiento y/o aparato que tenga una tendencia a detener o incluso desacelerar la forma molecular a la vez que permite que el portador proceda puede ser utilizado para retirar o hacer la forma molecular no detectable. De este modo, se puede utilizar un proceso similar a la cromatografía líquida de alta presión (“HPLC”) en la cual la fase inmóvil del aparato HPLC detiene o desacelera el progreso de la forma molecular mientras que la fase móvil, comprendiendo la forma activada-potenciada, procede a través del aparato relativamente sin impedimentos. Dependiendo de los parámetros tal como la afinidad de la forma molecular para la fase sólida, la forma molecular estará completamente ausente del resultado del aparato HPLC para por lo menos cierto periodo de tiempo conocido.

Adicionalmente, si están presentes moléculas de la sustancia de arranque en el solvente modificado, ellas pueden ser retiradas utilizando métodos bien aceptados. En particular, las moléculas de una proteína tomada como la sustancia de arranque pueden ser retiradas, por ejemplo, calentando el solvente modificado para lograr la desnaturalización de la proteína seguida por la filtración. De manera alternativa, se puede utilizar un método de desalación en donde la proteína es precipitada por medio de elevadas concentraciones de sales neutras de metales de tierra alcalina y álcali seguida por la filtración. Otros posibles métodos incluyen electrodiálisis; desionización utilizando resinas de intercambio iónico; ósmosis inversa; y ultrafiltración (filtración molecular) con o sin filtración preliminar a través de poros más grandes. A manera de ejemplos adicionales encontrados en el arte, hacer referencia a, B.M. Steward, *The production of high-purity water in the clinical laboratory*, Laboratory Medicine, volumen 31(11), pp. 605- 611 (2000); J. Grimm, D. Bessarabov, R. Sanderson, *Review of electro-assisted method for water purification*, Desalination, volumen 115 (3), pp. 285- 294 (1998); I.A. Koznacheev, et al., *Water purification of organic infusions in a reverse flow filtration combustion reactor*, International Journal of Heat and Mass Transfer, Volumen 54, pp. 932-937 (1998); Labconco Corporation, *A Guide to Laboratory Water Purification*, An Industry Service Publication. <http://bioresearchonline.com/doc.mvc/A-Guide-to-Laboratory-WaterPurification>.

El método reivindicado puede ser llevado a cabo utilizando diferentes métodos de determinación cuantitativa y cualitativa, asegurando de este modo sensibilidad y reproducibilidad elevadas durante la prueba de la presencia y potencia de una forma activada-potenciada. Los métodos cuantitativos y cualitativos incluyen espectrometría de masas tal como cromatografía y espectrometría de masas, cromatografía gas-líquido

("GLC") y cromatografía líquida de alto desempeño ("HPLC"); espectroscopia RMN, ensayo de inmunoenzima ("IEA").

5 La cromatografía se basa en la partición de los componentes de una mezcla ocasionada por la diferencia en su distribución homogénea entre dos fases inmiscibles. Una fase en la cromatografía es inmóvil (sorbente) mientras que otra es móvil (eluyente). La elevada presión (hasta 400 bar) y suspensión coloidal de solvente (generalmente 3-5 μm ; actualmente es hasta 1,8 μm) son características distintivas de la HPLC. La determinación cualitativa utilizando análisis HPLC se basa en la evaluación del tiempo de retención del pico
10 de la cromatografía. La determinación cuantitativa se basa en la evaluación del área pico.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear ("espectroscopia RMN") es una técnica de investigación que aprovecha las propiedades magnéticas de ciertos núcleos atómicos. La RMN determina las propiedades físicas y químicas de los átomos o las moléculas en los
15 cuales ellos están contenidos. Se basa en el fenómeno de la resonancia magnética nuclear y puede proveer información detallada acerca de la estructura, dinámica, estado de reacción, y medio ambiente químico de las moléculas. El campo magnético intramolecular alrededor de un átomo en una molécula cambia la frecuencia de resonancia, de este modo dando acceso a los detalles de la estructura electrónica de una molécula. El software
20 permite el análisis de la intensidad de la señal de los picos, que bajo condiciones de relajación óptima, se correlacionan con el número de protones de dicho tipo. El análisis de la intensidad de la señal se realiza mediante integración – el proceso matemático que calcula el área bajo una curva, su tamaño es dependiente de su área.

25 Un ensayo de inmunoenzima ("IEA") es una prueba bioquímica que mide la presencia o concentración de una macromolécula en una solución a través del uso de un anticuerpo o inmunoglobulina. La macromolécula detectada por medio del inmunoensayo es a menudo referida como un "analito". Idealmente, el anticuerpo se unirá con el analito y solamente al analito. Una vez unido al analito, el anticuerpo emite una señal indicativa de la presencia de
30 una única molécula de analito. Dicha señal podría ser la liberación espontánea inmediata de un fotón de luz luego de la unión o la liberación de un fotón de luz por los anticuerpos unidos al analito luego de la incidencia de cierta señal "de sondeo". De manera similar, los anticuerpos unidos al analito podrían reaccionar de forma diferente que los anticuerpos no unidos a una última etapa de IEA permitiendo, por ejemplo, la remoción de los anticuerpos
35 no unidos y la valoración del número de anticuerpos unidos remanentes. Además, los anticuerpos pueden estar unidos a un cristal piezoeléctrico que experimenta deformación

elástica cuando se aplica una corriente eléctrica al mismo. Una corriente eléctrica alterna (C.A.) produce una onda estacionaria en el cristal de una frecuencia característica. La frecuencia es altamente dependiente de las propiedades elásticas del cristal, cuyas propiedades se ven afectadas por aquello que está unido al cristal. La unión de un analito
5 objetivo a un anticuerpo producirá un cambio en la frecuencia de resonancia, lo que produce una señal de enlazamiento. Los métodos biológicos y otros métodos son aplicables para la realización del método reivindicado. Ver, por ejemplo, Zolotov, Yu. A. (editor), *Basics of analytical chemistry* (en 2 volúmenes), Textbook for universities, 3^{ra} edición (2004); Vasilyev, V.P., *Analytical chemistry*, (1989); Otto, M., *Up-to-date methods of analytical chemistry*,
10 (2003).

Utilizando una combinación de métodos analíticos para detectar las moléculas de la sustancia de arranque en dicho portador activado-potenciado y la medición por métodos analíticos de por lo menos un parámetro característico de la sustancia de arranque antes y
15 después de su interacción con dicho portador activado-potenciado, demostramos (sustanciamos) que: primero, la actividad modificadora asociada con el portador no debe ser atribuida por la presencia de las moléculas de la sustancia de arranque y que las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de dicho portador difieren de las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la sustancia de arranque, en segundo lugar, el portador
20 activado-potenciado es obtenido mediante el uso de la sustancia de arranque, en donde la forma activada-potenciada está asegurada por el mismo procedimiento empleado durante el tratamiento tecnológico de la sustancia de arranque y que está representado por múltiples reducciones en serie de la concentración de la última con el uso de dicho portador. Finalmente, sobre la base de la evidencia *in vitro*, la autenticidad e identidad se demuestran
25 para el producto de droga preparado utilizando dicho portador activado-potenciado. Esto es, comenzando con la forma molecular en concentración terapéutica se realiza la forma activada-potenciada a través de múltiples disminuciones consecutivas de la concentración de la forma molecular utilizando el portador. Además, la medición analítica reivindicada de por lo menos un parámetro característico de la forma terapéutica antes de su interacción con
30 la forma activada-potenciada y nuevamente después de dicha interacción sirve para cuantificar el grado de la potencia modificadora asociada con la forma activada-potenciada en unidades adimensionales relativas de actividad (actividad de liberación).

El grado de la potencia modificadora que corresponde a una forma activada-potenciada se
35 determina sobre la base de las alteraciones cuantitativas de un parámetro característico expresado en unidades de actividad relativa (actividad de liberación), fórmula (1):

$$X = C |A - A_M| / A \quad (1)$$

X es el número de unidades de actividad (UA);

5 C es una constante adimensional de proporcionalidad que es contingente en los métodos analíticos utilizados para medir el parámetro característico que refleja las propiedades físicas, químicas y/o biológicas iniciales de la sustancia de arranque y en el valor del parámetro característico. En particular, por ejemplo $C=10^k$, donde k es un número entero de la secuencia 1, 2, 3 etc.;

10

A es el valor de un parámetro característico de la sustancia de arranque antes de su interacción con dicha forma activada-potenciada (portador tecnológicamente tratado);

15 A_M es el valor del mismo parámetro característico de la sustancia de arranque después de su interacción con dicha forma activada-potenciada (portador tecnológicamente tratado).

El método reivindicado puede ser llevado a cabo utilizando diferentes metodologías de determinación cuantitativa y cualitativa, asegurando de este modo una elevada sensibilidad y reproducibilidad en las concentraciones ultra bajas de la sustancia para las pruebas, tal como espectrometría, en particular espectrometría de masas, cromatografía-espectrometría de masas (cromatografía gas-líquido (GLC)) y cromatografía líquida de elevado desempeño (HPLC) basadas en la separación de los componentes de una mezcla causada por la diferencia en su distribución homogénea entre dos fases inmiscibles. Una fase en la cromatografía se inmoviliza (sorbente) y la otra es móvil (eluyente). La elevada presión (hasta 400 bars) y la lechada de sorbente (en general 3 a 5 μm ; aquí hasta 1,8 μm) son características distintivas de la HPLC. La determinación cualitativa utilizando el análisis HPLC se basa en la evaluación del tiempo de retención del pico cromatográfico. La determinación cuantitativa se basa en la evaluación del área del pico.

30 Otra técnica que se utiliza en la realización del método reivindicado es la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (espectroscopia RMN) que aprovecha las propiedades magnéticas de ciertos núcleos atómicos. La RMN determina las propiedades físicas y químicas de los átomos o de las moléculas en las cuales ellos están contenidos. La misma se apoya en el fenómeno de la absorción por resonancia y la emisión de la energía
35 electromagnética por las sustancias con núcleos de espín nulo cuando se colocan en un

campo magnético externo a una frecuencia ν (denominada frecuencia RMN) que es inducida por la reorientación de los momentos nucleares magnéticos, en donde un denominado desplazamiento químico es el parámetro característico. Además, las técnicas mencionadas incluyen un inmunoensayo enzimático (IEA), el uso de un inmunosensor piezoeléctrico cuya

5 señal analítica está representada por una diferencia en la frecuencia de resonancia del resonador piezoeléctrico (Δf) resultante de aumentos o disminuciones en el peso de la capa cubierta por el receptor debido a la formación y destrucción del complejo inmune sobre su superficie. Los métodos biológicos así como otros métodos también se pueden aplicar para la realización del método reivindicado (por ejemplo, ver Zolotov, Yu. A. (editor), Basics of

10 analytical chemistry (2 volúmenes), Textbook for universities, 3^{ra} edición, revisada y complementada: Vysshaya shkola Publisher (2004); Vasilyev, V.P., Analytical chemistry, (1989); Otto, M., Up-to-date methods of analytical chemistry, (2003). Adicionalmente, si las moléculas de la sustancia de arranque están presentes en el solvente modificado, ellas pueden ser removidas utilizando métodos bien aceptados. En particular, las moléculas de

15 una proteína tomada como la sustancia de arranque pueden ser removidas, por ejemplo, al calentar el solvente modificado para lograr la desnaturalización de la proteína seguida por la filtración. De manera alternativa, se puede utilizar un método de desalación en donde la proteína es precipitada por medio de elevadas concentraciones de sales neutras de metales de tierra alcalina y álcali seguida por filtración. Otros posibles métodos incluyen

20 electrodiálisis; desionización utilizando resinas de intercambio iónico; ósmosis inversa; y ultrafiltración (filtración molecular) con o sin filtración preliminar a través de poros más grandes. A manera de ejemplos adicionales encontrados en el arte, hacer referencia a, B.M. Steward, The production of high-purity water in the clinical laboratory, Laboratory Medicine, 2000, volumen 31(11), pp. 605- 611; J. Grimm, D. Bessarabov, R. Sanderson, Review of

25 electro-assisted methods for water purification, Desalination, 1998, volumen 115 (3), pp. 285- 294; I.A. Koznacheev, et al., Water purification of organic inclusions in a reverse flow filtration combustion reactor, International Journal of Heat and Mass Transfer, 1998, Volumen 54, pp. 932-937; Labconco Corporation, A Guide to Laboratory Water Purification, An Industry Service Publication. [http://bioresearchonline.com/doc.mvc/A-Guide-to-](http://bioresearchonline.com/doc.mvc/A-Guide-to-Laboratory-WaterPurification)

30 [Laboratory-WaterPurification](http://bioresearchonline.com/doc.mvc/A-Guide-to-Laboratory-WaterPurification). (вставить правильную ссылку).

Al utilizar una combinación de métodos analíticos para detectar las moléculas de la sustancia de arranque en dicho portador activado-potenciado y la medición por métodos analíticos de por lo menos un parámetro característico de la sustancia de arranque antes y

35 después de su interacción con dicho portador activado-potenciado, demostramos (sustanciamos) que: primero, la actividad modificadora asociada con el portador no debe ser

atribuida por la presencia de las moléculas de la sustancia de arranque y que las propiedades fisicoquímicas y/o biológicas de dicho portador difieren de las propiedades fisicoquímicas y/o biológicas de la sustancia de arranque, en segundo lugar, el portador activado-potenciado es obtenido mediante el uso de la sustancia de arranque, en donde la forma activada-potenciada se logra a través del mismo procedimiento empleado durante el tratamiento tecnológico de la sustancia de arranque, es decir, múltiples reducciones en serie de la concentración de la última con el uso de dicho portador. Finalmente, sobre la base de la evidencia *in vitro*, la autenticidad e identidad se demuestran para el producto de droga preparado utilizando dicho portador activado-potenciado.

10

Además, la medición analítica reivindicada de por lo menos un parámetro característico de la sustancia de arranque antes y después de su interacción con el portador activado-potenciado sirve para cuantificar el grado de la potencia modificadora asociada con el portador en unidades adimensionales relativas de actividad (actividad de liberación)

15

Para determinar el grado de la potencia modificadora asociada con el portador, se llevan a cabo los siguientes procedimientos consecutivos:

a. preparación del portador con actividad modificadora potenciada en el curso del procesamiento tecnológico (tratamiento) de la sustancia de arranque mediante múltiples etapas de reducción en serie de la concentración utilizando dicho portador, en donde el último no contiene la forma molecular de dicha sustancia de arranque.

20

b. realización de las pruebas de especificidad de la sustancia presente en la solución de la etapa a.), lo que incluye

25

i. tratamiento de la forma molecular de la sustancia de arranque con el portador indicado en la etapa a.)

ii. de manera preferible, tratamiento de la forma molecular de una sustancia diferente y/o solvente con el portador indicado en la etapa a.)

30

medición analítica de por lo menos un parámetro fisicoquímico y/o biológico característico de dicha forma molecular de la sustancia de arranque (A) y dicha combinación bajo el párrafo b.) (A_M), en donde dicho portador modifica específicamente el efecto-capacidad para modificar las propiedades fisicoquímicas y/o biológicas de la sustancia de arranque se considera específica a la sustancia si el cambio en dicho parámetro característico con la realización del párrafo b.)i.) es estadísticamente significativo (y no es estadísticamente significativo con la realización del párrafo b.)ii.))

35

c. determinación de la potencia modificadora asociada con el portador en unidades de actividad relativas utilizando la ecuación (1):

$$X = C |A - A_M| / A \quad (1)$$

5

X, C, A y A_M son conforme se definen previamente, en donde C es de manera preferible igual a 100 ó 1000.

Ejemplos

10 La presente invención es ahora ilustrada por medio de los siguientes Ejemplos, los cuales no limitan el alcance de la presente invención en ningún sentido.

Abreviaturas generalmente utilizadas en los Ejemplos:

Ab – anticuerpos

15 ELISA o IEA – inmunoensayo enzimático de fase sólida

OD – densidad óptica

IFN-gamma – interferón gamma

HPLC – cromatografía líquida de elevado desempeño

AC – forma activada-potenciada

20 PBS –solución salina regulada con fosfato

APBS –solución salina regulada con fosfato activada de acuerdo con la técnica homeopática

IgG – inmunoglobulina G, incluyendo anticuerpos para interferón gamma (“IFN-gamma”)

agua A – agua activada de acuerdo con la técnica homeopática

UV/Vis – Ultravioleta hasta espectroscopia visible

25

Ejemplo 1

El propósito del Ejemplo 1 es determinar el grado de potencia modificadora de la forma activada-potenciada de Ab de conejo para IFN-gamma humano. Iniciando con una solución madre de Ab de conejo para IFN-gamma humano, una forma activada-potenciada de Ab de conejo para IFN-gamma humano se preparó mediante múltiples diluciones consecutivas disminuyendo la concentración de la sustancia de arranque acompañada por múltiples agitaciones intermedias. El diluyente, es decir, el portador, fue una solución agua-alcohol. La forma molecular se diluyó en 100^{12} , 100^{30} y 100^{50} partes del portador, es decir, las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C50. Para determinar las alteraciones de las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la sustancia de arranque, es decir, el Ab

35

de conejo para IFN-gamma humano, se aplicó HPLC mientras que el volumen de la sustancia se utilizó como el parámetro característico.

5 La determinación cuantitativa de la sustancia se basó en la evaluación del valor de área pico utilizando HPLC. La mezcla de IgG + AC se seleccionó como la muestra de prueba. Como las muestras de control se utilizaron las siguientes mezclas: IgG + agua A, IgG + agua y IgG + APBS.

10 Las muestras de prueba se prepararon al mezclar IgG (50 mg/ml) y AC (o agua A o APBS o agua) en una relación 1:2 (v/v). Las mezclas resultantes se filtraron utilizando filtros de membrana de acetato de celulosa, tamaño de poro – 0,45 µm.

15 El análisis fue llevado a cabo con separación por HPLC en modo gradiente. Se aplicó una columna de intercambio de aniones como fase estacionaria; la mezcla de 2 fases (fase 1 - acetonitrilo, fase 2 - solución de hidrógeno fosfato de potasio y solución de cloruro de potasio) se utilizaron como la fase móvil. Se aplicó un detector UV-Vis para el propósito de detección; longitud de onda – 280 nm.

20 Se llevaron a cabo la calibración y la puesta en cero de línea base del detector UV-Vis antes de cada análisis y después del mismo.

25 Las mezclas preparadas se transfirieron a frascos y se introdujeron en el sistema de cromatografía utilizando el procesador de muestras automático. El tiempo de análisis para cada una de las muestras de prueba fue de aproximadamente 23 minutos.

Luego de la completación del análisis se corrió el equilibrado de la columna cromatográfica a una tasa de flujo constante bajo las condiciones de la gradiente de la fase móvil similar a aquéllas en el inicio del análisis.

30 La señal emitida por las muestras de prueba se registró en la forma de cromatograma de picos, que se supone corresponden a las cadenas IgG ligeras y pesadas. Se calculó el área del primer máximo de los picos espectrofotométricos (Max -1 corresponde a las cadenas pesadas de inmunoglobulina) y el segundo máximo (Max -2 corresponde a las cadenas ligeras de inmunoglobulina). Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 1.

35

Tabla 1. Áreas de máximo pico cromatográfico

Muestra de prueba	Área de máximo pico cromatográfico		Potencia modificadora de sustancia en AU a C=100	
	Max-1	Max-2	Max-1	Max-2
IgG +AC	17207,9 ±434,7	45860,6 ±9427,3		
IgG + agua	30270,2±980,6	5577,4 ±467,5	43,2	722,3
IgG + agua A	28704,0 ±4265,3	5626 ±686,6	40,1	715,2
IgG + APBS	25888,7±1514,1	7135,7±746,0	33,5	542,7

El grado de potencia modificadora se calcula al aplicar la ecuación (1):

$$(X = C |A-A_M| / A)$$

5

en donde C=100. La ecuación (1) se aplica a la muestra IgG +AC y la muestra IgG + agua, lo que resulta en:

(Max-1) A=30270,2; A_M=17207,9; X=43,2 AU;

10 (Max-2) A=5577,4; A_M=45860,6; X=722,3AU

Los experimentos mostraron que AC para IFN-gamma disminuye el área del primer máximo de pico IgG (Max-1 corresponde a cadenas pesadas de inmunoglobulina) e incrementa el área de segundo máximo de pico IgG (Max-2 corresponde a cadenas ligeras de inmunoglobulina) en comparación con los controles.

15

Los resultados del Ejemplo 1 apoyan las siguientes conclusiones:

1. Debido a la técnica utilizada para la preparación de las diluciones homeopáticas C12, C30, C50, una forma activada-potenciada que comprende una mezcla de estas tres diluciones homeopáticas *a priori* no contiene moléculas de la sustancia de arranque;

20

2. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque, Ab de conejo para IFN-gamma humano, tratada mediante la forma activada-potenciada presentan evidencia confiable de que dicha forma activada-potenciada se prepara sobre la base de la sustancia de arranque-IFN-gamma;

25

3. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque, Ab de conejo para IFN-gamma humano, tratada mediante la forma activada-potenciada valida de manera significativa el grado de potencia modificadora asociada con la forma

activada-potenciada y provee la oportunidad para expresar dicha potencia modificadora revelada mediante la utilización de la técnica HPLC en unidades de actividad adimensionales de acuerdo con la ecuación (1) (Tabla 1).

5 Ejemplo 2

El propósito del Ejemplo 2 es determinar el grado de potencia modificadora de la forma activada-potenciada de Ab de conejo para IFN-gamma humano. Iniciando con una solución madre de Ab de conejo para IFN-gamma humano, una forma activada-potenciada de Ab de conejo para IFN-gamma humano se preparó mediante múltiples diluciones consecutivas disminuyendo la concentración de la sustancia de arranque acompañada por múltiples agitaciones intermedias. El diluyente, es decir, el portador, fue una solución agua-alcohol. La forma molecular se diluyó en 100^{12} , 100^{30} y 100^{50} partes del portador, es decir, las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C50. Para determinar las alteraciones de las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la sustancia de arranque, es decir, el Ab de conejo para IFN-gamma humano, se aplicó HPLC mientras que el volumen de la sustancia se utilizó como el parámetro característico.

La determinación cuantitativa de la sustancia se basó en la evaluación del valor de área pico utilizando HPLC. La mezcla de Ab para IFN-gamma + AC se seleccionó como la muestra de prueba. Como las muestras de control se utilizaron las siguientes mezclas: Ab para IFN-gamma + agua A, Ab para IFN-gamma + agua y Ab para IFN-gamma + APBS.

Las muestras de prueba se prepararon al mezclar Ab para IFN-gamma y AC (o agua A o APBS o agua) en la relación 1:1 (v/v). Las mezclas resultantes fueron sometidas a agitación vorticial por 15 segundos, incubadas a temperatura ambiente por 18 horas y luego se añadió AC, agua A, APBS o agua.

El análisis fue llevado a cabo con separación por HPLC en modo de gradiente. Se aplicó una columna de octadecilsilano de fase inversa como fase estacionaria; la mezcla de 2 fases (fase 1 – acetonitrilo complementado con ácido acético y ácido trifluoroacético, fase 2 - agua desionizada con ácido metílico y ácido trifluoroacético) se utilizaron como la fase móvil. Se aplicó un detector UV-Vis para el propósito de detección; longitud de onda – 280 nm.

La calibración y la puesta en cero de línea base del detector UV-Vis se llevaron a cabo antes de cada análisis y después del mismo.

Las mezclas preparadas se transfirieron a frascos y se introdujeron en el sistema de cromatografía utilizando el procesador de muestras automático. El tiempo de análisis para cada una de las muestras de prueba fue de aproximadamente 15 minutos.

- 5 Luego de la completación del análisis se corrió el equilibrado de la columna cromatográfica a una tasa de flujo constante bajo las condiciones de la gradiente de la fase móvil similar a aquéllas en el inicio del análisis.

- 10 La señal emitida por las muestras de prueba se registró en la forma de cromatograma de picos de la correspondiente proteína. Se calculó el área de pico espectrofotométrico. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Área de máximo pico cromatográfico

Muestra de prueba	Área de pico cromatográfico	Potencia modificadora de sustancia en AU a C=100
Ab para INF-gamma + forma AC de Ab para IFN-gamma	113,1±3,6	
Ab para INF-gamma + agua A	123,2±3,6	8,2
Ab para INF- gamma + agua	128,3±0,3	11,8

- 15 Se mostró que la forma activada-potenciada de Ab para IFN-gamma reduce el área pico de Ab para IFN-gamma en comparación con los controles.

Los resultados del Ejemplo 1 apoyan las siguientes conclusiones:

1. Debido a la técnica utilizada para la preparación de las diluciones homeopáticas C12, 20 C30, C50, una forma activada-potenciada que comprende una mezcla de estas tres diluciones homeopáticas *a priori* no contiene moléculas de la sustancia de arranque;
2. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque, Ab de conejo para IFN-gamma humano, tratada mediante la forma activada-potenciada valida de manera significativa que dicha forma activada-potenciada se prepara sobre la base 25 de la sustancia de arranque-Ab para el interferón gamma (anti-IFN-gamma);
3. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque, Ab de conejo para IFN-gamma humano, tratada mediante la forma activada-potenciada valida de manera significativa el grado de potencia modificadora asociada con la forma activada-potenciada y provee la oportunidad para expresar dicha potencia modificadora

revelada mediante la utilización de la técnica HPLC en unidades de actividad adimensionales de acuerdo con la ecuación (1) (Tabla 2).

Ejemplo 3

5 El propósito del Ejemplo 3 es determinar el grado de potencia modificadora de la forma activada-potenciada de diclofenac sódico. Iniciando con una solución madre de diclofenac sódico, una forma activada-potenciada de diclofenac sódico se preparó mediante múltiples diluciones consecutivas disminuyendo la concentración de la sustancia de arranque acompañada por múltiples agitaciones intermedias. El diluyente, es decir, el portador, fue
10 una solución agua-alcohol. La forma molecular se diluyó en 100^{12} , 100^{30} y 100^{200} partes del portador, es decir, las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C200. Para determinar las alteraciones de las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la sustancia de arranque, es decir, diclofenac sódico, se aplicó HPLC mientras que el volumen de la sustancia se utilizó como el parámetro característico.

15 La determinación cuantitativa de la sustancia se basó en la evaluación del valor de área pico utilizando HPLC. La mezcla de diclofenac + lactosa, saturada con AC se seleccionó como la muestra de prueba. Como las muestras de control se utilizaron las siguientes mezclas: diclofenac + lactosa, saturada con APBS, y diclofenac + lactosa no saturada.

20 Las muestras de prueba se presentaron en la forma de diclofenac sódico en polvo, lactosa no saturada y lactosa saturada con AC (APBS). Los polvos se disolvieron en agua destilada, la relación de cantidad pesada de diclofenac y cantidad pesada de lactosa fue de 1:3; el volumen de agua utilizada para la disolución fue idéntica. Las soluciones preparadas se mezclaron con solución de diclofenac sódico en la relación 1:3 (v/v). Las soluciones se
25 mezclaron mediante sacudida manual vertical de los frascos por 15 segundos. Se utilizó un bidestilado para diluir la mezcla de soluciones a fin de alcanzar la concentración final de 0,3 µg/ml. Las soluciones fueron sometidas a agitación manual por 15 segundos mediante sacudida vertical de los matraces. Las mezclas resultantes fueron incubadas en un lugar
30 oscuro a temperatura ambiente por 18 horas.

El análisis fue llevado a cabo con separación por HPLC en modo de gradiente. La columna empaquetada con gel de sílice y modificada con octadecilo se aplicó como fase estacionaria; la mezcla de 2 fases (fase 1 – agua destilada con ácido fórmico y ácido trifluoroacético, fase
35 2 – acetonitrilo con ácido fórmico y ácido trifluoroacético) se utilizaron como la fase móvil. Se aplicó un detector UV-Vis para el propósito de detección; longitud de onda – 276 nm.

La calibración y la puesta en cero de línea base del detector UV-Vis se llevaron a cabo antes de cada análisis.

5 Las mezclas preparadas se transfirieron a frascos y se introdujeron en el sistema de cromatografía utilizando el procesador de muestras automático. El tiempo de análisis para cada una de las muestras de prueba fue de aproximadamente 15 minutos.

10 Luego de la completación del análisis se corrió el equilibrado de la columna cromatográfica a una tasa de flujo constante bajo las condiciones de la gradiente de la fase móvil similar a aquéllas en el inicio del análisis.

15 La señal emitida por las muestras de prueba se registró en la forma de cromatograma de picos que corresponden a diclofenac. Se calculó El área de pico espectrofotométrico. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 3 (la detección fue llevada a cabo a 276 nm).

Tabla 3. El área de máximo pico cromatográfico

Muestra de prueba	Área de pico cromatográfico	Potencia modificadora de sustancia en AU a C=100
Diclofenac + lactosa saturada con AC	66039,3±549,1	
Diclofenac + lactosa saturada con APBS	42652,0±484,2	54,8
Diclofenac + lactosa no saturada	32004,3±1113,7	106,3

20 Se mostró que el área pico del diclofenac mezclado con AC excede el área pico del diclofenac mezclado con los controles, es decir, lactosa no saturada y lactosa saturada con APBS.

Los resultados del Ejemplo 3 apoyan las siguientes conclusiones:

25 1. Debido a la técnica utilizada para la preparación de las diluciones homeopáticas C12, C30, C50, una forma activada-potenciada que comprende una mezcla de estas tres diluciones homeopáticas *a priori* no contiene moléculas de la sustancia de arranque;

2. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque, diclofenac, tratada mediante la forma activada-potenciada de diclofenac, valida de manera significativa que dicha forma activada-potenciada se prepara sobre la base de la sustancia de arranque-diclofenac;

5 3. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque, diclofenac, tratada mediante la forma activada-potenciada de diclofenac valida de manera significativa el grado de potencia modificadora asociada con la forma activada-potenciada y provee la oportunidad para expresar dicha potencia modificadora revelada mediante la utilización de la técnica HPLC en unidades de actividad adimensionales de acuerdo con la
10 ecuación (1) (Tabla 3).

Ejemplo 4

El propósito del Ejemplo 4 es determinar el grado de potencia modificadora de la forma activada-potenciada de Ab de conejo para IFN-gamma humano. Iniciando con una solución
15 madre de Ab de conejo para IFN-gamma humano, se preparó una forma activada-potenciada de Ab de conejo para IFN-gamma humano mediante múltiples diluciones consecutivas disminuyendo la concentración de la sustancia de arranque acompañada por múltiples agitaciones intermedias. El diluyente, es decir, el portador, fue una solución agua-alcohol. La forma molecular se diluyó en 100^{12} , 100^{30} y 100^{50} partes del portador, es decir,
20 las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C50. Para determinar las alteraciones de las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la sustancia de arranque, es decir, el Ab de conejo para IFN-gamma humano, se aplicó ELISA mientras que la alteración en el número de complejos antígeno-anticuerpo se utilizó como el parámetro característico.

25 Antes de llevar a cabo el análisis, Ab para IFN-gamma y AC (o APBS que se utiliza como placebo) fueron preincubados por 24 horas a 4 °C; durante la incubación Ab para IFN-gamma se enlazó con el IFN-gamma contenido en la solución. Después de la incubación, cada muestra fue expuesta a una placa ELISA que tiene una superficie de antígeno en fase sólida. El Ab para IFN-gamma previamente enlazado al IFN-gamma fue adsorbido sobre la
30 fase sólida de la placa ELISA. El Ab para IFN-gamma que permanece sin enlazarse al IFN-gamma después de la incubación se quedó en la solución.

Las muestras resultantes fueron probadas de acuerdo con los procedimientos ELISA. La cantidad de complejos antígeno-anticuerpo formados adsorbidos sobre la fase sólida fue
35 determinada al medir la densidad óptica de las soluciones en pozos de platos tomando en consideración la reacción de extinción de la solución de cromógeno, cuyo color cambia

sobre el fondo de la descomposición inducida por enzimas del sustrato. Para determinar la extinción de la solución se aplicó la técnica espectrofotométrica a una longitud de onda 490 nm en un modo de onda único. Cuanto más complejos antígeno-anticuerpo se formaron en un plato menos Ab para IFN-gamma se enlazó con el IFN-gamma en la solución.

5

La OD promedio de las muestras para 2 experimentos similares incubadas con AC fue de $0,603 \pm 0,075$ (cuando AC o placebo fueron inmediatamente mezclados con el antígeno y con Ab para IFN-gamma y fueron incubadas por 24 horas) o $0,251 \pm 0,027$ (cuando AC o placebo se mezclaron con Ab para IFN-gamma mientras que luego de la incubación por 40 minutos se añadió antígeno y se llevó a cabo la incubación de 24 horas) mientras que para IFN-gamma incubado con APBS los valores de densidad óptica fueron $0,812 \pm 0,084$ y $0,391 \pm 0,023$ respectivamente.

Los experimentos han mostrado que soluciones acuosas de AC disminuyeron el número de complejos antígeno- anticuerpo en la solución en comparación con el control, lo cual valida la identidad de la droga que contiene los anticuerpos de conejo para el interferón – gamma humano (Ab para IFN γ).

Los resultados del Ejemplo 4 apoyan las siguientes conclusiones:

1. Debido a la técnica utilizada para la preparación de las diluciones homeopáticas C12, C30, C50, una forma activada-potenciada que comprende una mezcla de estas tres diluciones homeopáticas *a priori* no contiene moléculas de la sustancia de arranque;
2. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque, Ab de conejo para IFN-gamma humano, tratada mediante la forma activada-potenciada valida de manera significativa que dicha forma activada-potenciada se prepara sobre la base de la sustancia de arranque IFN-gamma;
3. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque, Ab de conejo para IFN-gamma humano, tratada mediante la forma activada-potenciada valida de manera significativa el grado de potencia modificadora asociada con la forma activada-potenciada y provee la oportunidad para expresar dicha potencia modificadora revelada mediante la utilización de la técnica HPLC en unidades de actividad adimensionales de acuerdo con la ecuación (1) (Tabla 2). El grado de actividad modificadora calculado utilizando la ecuación (1) (en comparación con el placebo) fue de 25,7- 35,8 AU.

35

Ejemplo 5

El propósito del Ejemplo 5 es determinar el grado de potencia modificadora de la forma activada-potenciada de Ab de conejo para IFN-gamma humano. Iniciando con una solución madre de Ab de conejo para IFN-gamma humano, una forma activada-potenciada de Ab de conejo para IFN-gamma humano se preparó mediante múltiples diluciones consecutivas disminuyendo la concentración de la sustancia de arranque acompañada por múltiples agitaciones intermedias. El diluyente, es decir, el portador, fue una solución agua-alcohol. La forma molecular se diluyó en 100^{12} , 100^{30} y 100^{50} partes del portador, es decir, las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C50. Para determinar las alteraciones de las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la sustancia de arranque, es decir, el Ab de conejo para IFN-gamma humano, se midió la habilidad de los anticuerpos adsorbidos sobre una superficie de inmunosensor piezoeléctrico para enlazarse con el antígeno tratado mediante la forma activada-potenciada.

15 Abreviaturas específicas para el Ejemplo 5:

Δf –alteraciones de la frecuencia de oscilación del inmunosensor piezoeléctrico

APTS – γ -aminopropiltriétoxissilano

S_r – desviación estándar

20 Una señal analítica de un inmunosensor piezoeléctrico comprende un cambio en la frecuencia de oscilación (Δf) de un resonador de cristal de cuarzo dependiendo del incremento o disminución en la masa del bioreceptor. Dicho cambio en la masa puede surgir de la formación o destrucción de un complejo inmune sobre la superficie del sensor. Durante el estudio dado se evaluó el efecto de la composición de las muestras analizadas sobre la señal analítica del sensor. Una mezcla de IFN-gamma y la forma activada-potenciada (“AC”) del IFN-gamma se seleccionó como la muestra de prueba. Una mezcla de IFN-gamma y APBS se utilizó como una muestra de control. Las muestras fueron probadas en la forma de soluciones acuosas.

30 Para crear el inmunosensor, se formó una capa de receptor de bio-reconocimiento basado en APTS sobre un elemento piezoeléctrico. Utilizando la superficie de micro jeringa del electrodo de oro del sensor (diámetro 8 mm) que fue en consecuencia recubierto con $0,8 \mu\text{l}$ de APTS (que fue secado en un desecador por 20 minutos a $80 \text{ }^\circ\text{C}$), $5 \mu\text{L}$ de glutaraldehído (2,5% de soluto en agua destilada) y luego $5 \mu\text{l}$ de solución de los anticuerpos para IFN-gamma (9,6 ng/ml). Para cada medición se formó una nueva capa de receptor de bio-reconocimiento.

- La preparación preliminar de la muestra incluyó la mezcla de 50 µl de IFN-gamma (30 mg/ml) con 50 µl de la muestra de prueba. La muestra fue entonces calentada por 45 minutos a 37 °C y se mezcló por 10 minutos mediante centrifugación (1000 rpm). La superficie del sensor con Ab inmovilizado para IFN-gamma fue recubierto con 2,5 µl de la solución resultante, mantenida por minutos, lavada con agua destilada, secada para adquirir peso constante y fue llevada a cabo la medición de la señal estática del sensor. Las alteraciones del enlazamiento antígeno-anticuerpo fueron evaluadas a partir de la alteración en la masa de la molécula de interferón.
- 5 Se utilizaron como sensores los resonadores piezoeléctricos fabricados de un cristal de cuarzo de corte AT con electrodo de oro de 8 mm (ZAO ETNA, Moscú). Para registrar la señal analítica se aplicó una computadora personal y un transductor DiScope (NPP Bafika, Moscú).
- 10 Los resultados del experimento se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto de la composición de la muestra de prueba sobre la señal analítica del sensor

Composición de la muestra	Δf (M \pm SD)	Potencia modificadora de sustancia en AU a C=100
IFN-gamma + AC	89 \pm 4	
IFN-gamma + APBS	123 \pm 5	2764,2

Los experimentos han mostrado que la adición de la forma activada-potenciada a la forma terapéutica de IFN-gamma afecta la frecuencia del resonador piezoeléctrico induciendo su reducción en comparación con los controles.

Los resultados del Ejemplo 5 apoyan las siguientes conclusiones:

1. Debido a la técnica utilizada para la preparación de las diluciones homeopáticas C12, C30, C50, una forma activada-potenciada que comprende una mezcla de estas tres diluciones homeopáticas *a priori* no contiene moléculas de la sustancia de arranque;
2. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque, IFN-gamma, tratada mediante la forma activada-potenciada valida de manera significativa que dicha forma activada-potenciada se prepara sobre la base de la sustancia de arranque-Ab para interferón gamma (anti-IFN-gamma);
3. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque, Ab de conejo para IFN-gamma humano, tratada mediante la forma activada-potenciada

valida de manera significativa el grado de potencia modificadora asociada con la forma activada-potenciada y provee la oportunidad para expresar dicha potencia modificadora revelada mediante la utilización de un sensor piezoeléctrico en unidades de actividad adimensionales de acuerdo con la ecuación (1) (Tabla 4). El grado de actividad modificadora calculado utilizando la ecuación (1) (en comparación con placebo) fue de 2764,2 AU.

Ejemplo 6

Análisis de las alteraciones de actividad neutralizante de los anticuerpos para IFN-gamma tratados mediante la liberación de anticuerpos activos para IFN-gamma; el método aplicado es la medición de la actividad neutralizante.

El propósito del Ejemplo 6 es determinar el grado de potencia modificadora de la forma activada-potenciada de Ab de conejo para IFN-gamma humano. Iniciando con una solución madre de Ab de conejo para IFN-gamma humano, una forma activada-potenciada de Ab de conejo para IFN-gamma humano se preparó mediante múltiples diluciones consecutivas disminuyendo la concentración de la sustancia de arranque acompañada por múltiples agitaciones intermedias. El diluyente, es decir, el portador, fue una solución agua-alcohol. La forma molecular se diluyó en 100^{12} , 100^{30} y 100^{50} partes del portador, es decir, las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C50. Para determinar las alteraciones de las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la sustancia de arranque, es decir, el Ab de conejo para IFN-gamma humano, se utilizó la alteración de la actividad neutralizante de Ab para IFN-gamma tratados mediante la forma activada-potenciada de Ab para IFN-gamma mientras que la alteración en el número de células supervivientes después de la infección viral se utilizó como el parámetro característico.

Abreviaturas específicas para el Ejemplo 6:

R (X) – RPM1-1640, medio de cultivo que contiene X% - suero fetal bovino

NA – actividad neutralizante

CPE – efecto citopático

La actividad neutralizante, medida como NA/ml, de las drogas que contienen anticuerpos se basa en la inhibición del enlazamiento IFN-gamma con su receptor expresado en la membrana celular.

35

Actividad neutralizante de las muestras de Ab de conejo policlonal para IFN-gamma en medio de cultivo R(1)] en presencia de la forma activada-potenciada ("AC") o una muestra de control (agua destilada).

- 5 Las células HEp-2 de fibroblasto de pulmón embrionario humano cultivadas fueron tripsinizadas, suspendidas en 10 ml R(10) y fueron colocadas en un plato a una concentración de $2,3 \times 10^5$ células/pozo (100 μ l/pozo). Las células fueron incubadas 24 horas a 37 °C en una incubadora humidificada con 7% de CO₂. El IFN-gamma fue sometido a dilución en etapas en R(1), desde 500 ng/ml hasta 3,9 ng/ml e insertado en los pozos.
- 10 Anticuerpos policlonales de conejo para IFN-gamma (2 diluciones consecutivas en (1) empezando desde la dilución milesimal) y mezclados con el IFN-gamma en concentración fija (250 ng/ml) y AC (10% (v/v) en R(1)) o en agua destilada (10% (v/v) en R(1)). Los platos fueron incubados 1 hora a 37 °C.
- 15 Después de la incubación, los pozos fueron vaciados y se añadió el virus de la estomatitis vesicular en R(1) en la cantidad de 100 μ l/pozo. Después de que las células fueron incubadas por 20-24 horas a 37 °C hasta que el CPE en los pozos de línea de control excedió el 90%.
- 20 Luego de la remoción del medio cultivado las células remanentes fueron lavadas con PBS (200 μ l/pozo) y tratadas con cloruro de metilrosanilina en formalina (50 μ l/pozo) por 15 minutos a temperatura ambiente. Se observó 100% de tinción de la monocapa cuando todas las células estuvieron vivas; si las células estuvieron muertas (CPE) no se observó la tinción de la monocapa.
- 25 El plato fue lavado con agua. Los pozos con diluciones que demuestran aproximadamente 50% de CPE fueron visualmente identificados y luego fueron probados utilizando espectrofotometría.
- La evaluación del efecto se basa en la cantidad de células supervivientes (relación de células supervivientes al número total de células). La reducción de la actividad neutralizante de Ab para IFN-gamma fue considerado que es el criterio de evaluación del efecto de la forma activada-potenciada. Para calcular la actividad neutralizante de las drogas se aplicó la siguiente ecuación: $F \times A \times 10/C$, en donde F = el valor recíproco de la dilución de anticuerpos, A = EU/ml de la droga estándar a 50% de CPE, y C = concentración de anticuerpos (mg/ml).
- 35

El experimento ha mostrado que:

- 5 - cuando se incubaba IFN-gamma humano (500 ng/1 ml de medio de cultivo) con fibroblasto embrionario humano, células HEp-2 de línea celular derivada de pulmón ($2,3 \times 10^5$ células/pozo) infectadas con el virus de la estomatitis vesicular ($1,6 \times 10^5$ PFU/ml), se apreció la completa inhibición del efecto citopático del virus (100% de las células infectadas sobrevivieron);
- 10 - cuando se incubaba IFN-gamma humano (500 ng/1 ml de medio de cultivo) y Ab policlonal de conejo para IFN-gamma ($0,525 \mu\text{g}/1$ ml de medio de cultivo) con fibroblasto embrionario humano, células HEp-2 de línea celular derivadas de pulmón ($2,3 \times 10^5$ células/pozo) infectadas con el virus de la estomatitis vesicular ($1,6 \times 10^5$ PFU/ml), se apreció 50% de inhibición del efecto citopático del virus (50% de las células infectadas sobrevivieron);
- 15 - cuando se incubaba IFN-gamma humano (500 ng/1 ml de medio de cultivo) y Ab policlonal de conejo para IFN-gamma ($0,525 \mu\text{g}/1$ ml de medio de cultivo), así como también la forma activada-potenciada (10% (v/v) del medio de cultivo) fibroblasto embrionario humano, células HEp-2 de línea celular derivada de pulmón ($2,3 \times 10^5$ células/pozo) infectadas con virus de la estomatitis vesicular ($1,6 \times 10^5$ PFU/ml), se apreció 75% de inhibición del efecto citopático del virus (75% de las células infectadas sobrevivieron);

20 Aparte de eso se reveló que la forma activada-potenciada produjo el efecto de modulación sobre los anticuerpos policlonales que modulan la actividad.

Los resultados del Ejemplo 6 apoyan las siguientes conclusiones:

- 25 1. Debido a la técnica utilizada para la preparación de las diluciones homeopáticas C12, C30, C50, una forma activada-potenciada que comprende una mezcla de estas tres diluciones homeopáticas *a priori* no contiene moléculas de la sustancia de arranque;
2. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque, Ab de conejo para IFN-gamma humano, tratada mediante la forma activada-potenciada valida de manera significativa que dicha forma activada-potenciada se prepara sobre la base de la sustancia de arranque Ab de conejo para IFN-gamma humano;
- 30 3. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque tratada mediante lo anteriormente mencionado – dicha forma activada-potenciada valida de manera significativa el grado de potencia modificadora asociada con el portador y provee la oportunidad para expresar dicha potencia modificadora en unidades de actividad adimensionales de acuerdo con la ecuación (1), la cual, sobre la base de las mediciones de
35 la actividad neutralizante, fue igual a 50 AU.

Ejemplo 7

- El propósito del Ejemplo 7 es determinar el grado de potencia modificadora de la forma activada-potenciada de Ab de conejo para IFN-gamma humano. Iniciando con una solución madre de Ab de conejo para IFN-gamma humano, una forma activada-potenciada de Ab de conejo para IFN-gamma humano se preparó mediante múltiples diluciones consecutivas disminuyendo la concentración de la sustancia de arranque acompañada por múltiples agitaciones intermedias. El diluyente, es decir, el portador, fue una solución agua-alcohol. La forma molecular se diluyó en 100^{12} , 100^{30} y 100^{50} partes del portador, es decir, las diluciones homeopáticas centesimales C12, C30, C50. Para determinar las alteraciones de las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la sustancia de arranque, es decir, el Ab de conejo para IFN-gamma humano, mediante la forma activada-potenciada de Ab para IFN-gamma humano, se utilizaron espectroscopia y RMN mientras que la información acerca de la estructura molecular de la sustancia se utilizó como el parámetro característico.
- Para determinar las alteraciones conformacionales de los anticuerpos para IFN-gamma (Ab para IFN-gamma) tratados mediante la forma activada-potenciada ("AC"), se aplicó Espectroscopia de RMN. Se utilizaron diluciones homeopáticas de agua purificada como control.
- Para preparar las muestras de prueba AC o agua purificada se mezcló con solución de Ab para IFN-gamma en la relación 2:1. La concentración final de Ab para IFN-gamma en cada muestra fue de 0,8 mg/ml.
- Se utilizó un instrumento de RMN Brucker Avance 700 (que opera a la frecuencia de 700 MHz) para llevar a cabo el experimento. Las muestras de prueba se introdujeron en el campo magnético del dispositivo. Se observó la excitación del isótopo magnético de hidrógeno $1H$. La señal de las muestras de prueba se registró en la forma de espectros RMN (acumulación de señal por 12 horas), que caracteriza la estructura y estado conformacional de Ab para IFN-gamma.
- La evaluación de la condición conformacional de Ab para IFN-gamma fue llevada a cabo en el marco del análisis comparativo de los espectros adquiridos de la muestra que contienen Ab para IFN-gamma +AC o Ab para IFN-gamma + agua purificada. La comparación fue llevada a cabo mediante superposición espectral con el escalamiento apropiado.
- Los resultados del estudio mostraron que la adición de la forma activada-potenciada a Ab para IFN-gamma produjo las alteraciones en el espectro de Ab para IFN-gamma en el rango

de 8-8,5 ppm, 7,6-7,8 ppm, 6-6,6 ppm en comparación con el espectro de Ab para IFN-gamma + agua purificada. La Figura 1 muestra la superposición de los espectros de Ab para IFN-gamma + AC y Ab para IFN-gamma + agua purificada.

- 5 El experimento ha mostrado que la forma activada-potenciada afecta la conformación de Ab para IFN-gamma en solución.

Los resultados del Ejemplo 7 apoyan las siguientes conclusiones:

1. Debido a la técnica utilizada para la preparación de diluciones homeopáticas C12, C30, C50, una forma activada-potenciada que comprende una mezcla de estas tres diluciones homeopáticas *a priori* no contiene moléculas de la sustancia de arranque;
 2. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque, Ab de conejo para IFN-gamma humano, tratada mediante la forma activada-potenciada valida de manera significativa que dicha forma activada-potenciada se prepara sobre la base de la sustancia de arranque Ab de conejo para IFN-gamma humano;
 3. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de arranque tratada de dicha forma activada-potenciada valida de manera significativa el grado de potencia modificadora asociada con la forma activada-potenciada.
- 20 La descripción, ejemplos y dibujos contenidos en la presente representan la configuración actualmente preferida de la presente invención y son, como tales, una representación del tema objeto el cual es ampliamente contemplado por la presente invención. El alcance de la presente invención abarca totalmente otras configuraciones que podrían hacerse obvias a aquellas personas expertas en la técnica, y el alcance de la presente invención está por
- 25 consiguiente limitada única y exclusivamente por las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la determinación de la actividad de la forma activada-potenciada de una sustancia, dicho método comprende:
 - 5 proveer una forma activada-potenciada de una sustancia,
 - asegurar la ausencia de la forma molecular de la sustancia en dicha forma activada-potenciada,
 - proveer una forma molecular de dicha sustancia,
 - medir por lo menos un parámetro físico, químico o biológico (A) de dicha forma molecular de
 - 10 dicha sustancia utilizando un método analítico adecuado,
 - tratar dicha forma molecular de dicha sustancia con dicha forma activada-potenciada de dicha sustancia, y
 - medir dicho por lo menos un parámetro físico, químico o biológico (A_M) de dicha forma molecular tratada de dicha sustancia utilizando dicho método analítico,
 - 15 caracterizado porque dicha actividad de dicha forma activada-potenciada de dicha sustancia es el grado de diferencia entre A y A_M .
2. El método de conformidad con la Reivindicación 1, que comprende además expresar dicha actividad de dicha forma activada-potenciada de dicha sustancia en unidades relativas (X) de acuerdo con la fórmula $X = C (A - A_M) / A$, donde C es una constante adimensional de
- 20 proporcionalidad que es $C = 10^k$ donde k es un número entero de la secuencia 1, 2, 3, etc..
3. El método de conformidad con la Reivindicación 1, que comprende además i) tratar una forma molecular de una sustancia diferente con dicha forma activada-potenciada de la primera sustancia, ii) medir dicho por lo menos un parámetro físico, químico o biológico (B) de dicha forma molecular de dicha sustancia diferente con dicho método analítico, iii) medir
- 25 dicho por lo menos un parámetro físico, químico o biológico (B_M) de dicha forma molecular tratada de dicha sustancia diferente utilizando dicho método analítico para determinar la especificidad de dicho método, caracterizado porque dicho método se considera específico cuando dicho por lo menos un parámetro físico, químico o biológico cambia en modo estadísticamente significativo para $A - A_M$ y no cambia en modo estadísticamente
- 30 significativo para $B - B_M$.
4. El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque dicho método analítico es cromatografía líquida de elevado desempeño.
5. El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque dicho método analítico es análisis inmunoenzimático.
- 35 6. El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque dicho método analítico es resonancia magnética nuclear.

7. El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque dicha etapa de asegurar la ausencia de la forma molecular de la sustancia comprende retirar la forma molecular de dicha sustancia.
8. El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque dicha sustancia es un anticuerpo.
- 9 El método de conformidad con la Reivindicación 8, caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
- 10 El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque dicha sustancia es una pequeña molécula orgánica.
- 10 11. El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque dicha forma activada-potenciada es un líquido.
12. El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque dicha forma activada-potenciada se impregna sobre un portador sólido.