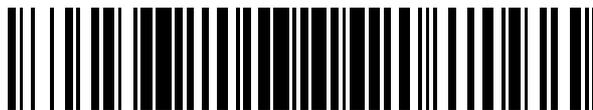


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 902**

21 Número de solicitud: 201590110

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 2013111962**

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 modificación de la potencia de un medicamento**

57 Resumen:

Método para la determinación de la intensidad de la modificación de la potencia de un medicamento.

La invención comprende un método para la determinación del grado de potencia modificada de un medicamento que comprende un componente terapéutico y un componente homeopático activado-potenciado, donde el componente activado-potenciado tiene algún efecto físico, químico o biológico sobre el componente terapéutico y/o la eficacia farmacológica del mismo. El componente terapéutico está biológicamente relacionado con la sustancia de partida del componente homeopático. Una medición analítica de al menos un parámetro característico de la forma terapéutica se realiza antes de su interacción con la forma activada-potenciada; la(s) misma(s) medición(es) analítica(s) se llevan a cabo después de la interacción entre las formas terapéutica y activada-potenciada. Estas mediciones sirven para cuantificar el grado de potencia modificadora asociada con la forma activada-potenciada en unidades relativas adimensionales de actividad (actividad de liberación).

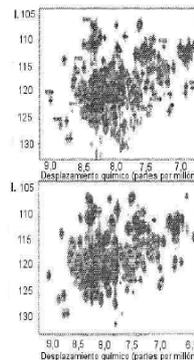


FIG. 1

## DESCRIPCIÓN

Método para la determinación de la intensidad de la modificación de la potencia de un medicamento

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Rusa No. 2013111962, presentada el 18 de Marzo de 2013, la cual se incorpora al presente documento por referencia en su integridad.

### 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 fármacos, especialmente los fármacos en los que por lo menos un componente de los mismos se prepara de acuerdo con las técnicas homeopáticas, de una manera fiable y reproducible.

### 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 disolvente 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 de EE.UU. 2011/0008452). El resultado de la preparación mediante potenciación homeopática es un medicamento que contiene dosis bajas o ultra-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, se hace referencia a la dilución como trituración. A través de las técnicas homeopáticas el portador puede adquirir potencia modificadora, la cual se manifiesta en su habilidad para alterar las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la sustancia de partida cuando es tratada con dicha forma activada-potenciada (RU 2161955 C1). El portador activado-potenciado puede adquirir una potencia modificadora capaz de alterar propiedades físicas, químicas y/o

biológicas de una sustancia que contiene moléculas similares en su estructura a las de las moléculas de la sustancia de partida cuando se trata con dicha forma activada-potenciada.

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 en  $6,022 \times 10^{23}$  moléculas de ácido acetilsalicílico y pesa 180,157 gramos.

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 se somete a impacto externo. Preferiblemente, el impacto externo involucra múltiples sacudidas verticales (dinamización) de cada dilución. Esto da como resultado 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. Se llevan a cabo procedimientos similares con el factor de dilución pertinente para obtener, por ejemplo, diluciones C30, C50 y C200. Este método es bien aceptado en la técnica homeopática. Ver, por ejemplo, V. Schwabe “Homeopathic medicines”, M., 1967, p. 14-29, incorporada en la presente memoria por referencia para los propósitos establecidos. C12, C30, y C200 representan diluciones de la solución matriz primaria (tintura madre) de anticuerpos  $100^{12}$ ,  $100^{30}$  y  $100^{200}$  veces, respectivamente.

Las formas activadas-potenciadas preferidas a menudo son una mezcla de varias 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 diversas

diluciones homeopáticas, cada componente de la composición, por ejemplo, C12, C30, C50, C200, se prepara de forma separada de acuerdo con el procedimiento descrito más arriba 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  
5 acuerdo con la composición de la mezcla y se mezcla con la cantidad requerida del portador, es decir, 97 partes por dilución centesimal.

Se describen ejemplos de potenciación homeopática en las patentes de EE.UU. Nos. 7.572.441 y 7.582.294, las cuales se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad y para los propósitos establecidos. El término “forma activada-potenciada” y el  
10 término “dosis ultra-baja” están concebidos completamente como de apoyo y principalmente son sinónimos uno del otro.

#### VALORACIÓN CUALITATIVA/CUANTITATIVA DE MEDICAMENTOS

Es conocido en la técnica, por ejemplo, la RU 2181890 C1, un método para determinar la actividad biológica de una sustancia. La actividad es representada por una relación entre la  
15 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*. Sin embargo, este método no es adecuado para determinar la potencia de los medicamentos preparados de acuerdo con las técnicas homeopáticas.

Es conocido en la técnica el método para la determinación de la potencia de un  
20 medicamento homeopático 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 con el tiempo de los valores de su intensidad de componente polarizado en el modo de desviación óptica desde diferentes puntos del medio de prueba. Se realiza el análisis para calcular el espectro  
25 de frecuencias de fluctuaciones muy bajas de la intensidad transmitida y los datos se comparan con un espécimen estándar. Ver, por ejemplo, la RU 2112976 C1.

También es conocido el método para la determinación cualitativa de la medicina homeopática o la forma activada-potenciada. El método incluye el tratamiento de un medio de prueba con una muestra estándar y el registro de las alteraciones de parámetros físicos y  
30 químicos. Se utiliza un conjunto de sustancias conocidas cuya estructura y/o composición son aproximadamente similares o similares a las de la medicina homeopática determinada o a las de la forma potenciada de la sustancia así como también la estructura y/o composición de los anticuerpos contra estas sustancias conocidas. La identificación de la medicina

homeopática o forma potenciada de la sustancia se basará en la sustancia conocida, cuya reacción con el anticuerpo apropiado cuando se introduce la medicina homeopática o forma potenciada de la sustancia en el medio de reacción está acompañada por alteraciones que se registran utilizando métodos analíticos inmunoquímicos que se basan en la reacción  
5 antígeno-anticuerpo (RU 2195648 C2).

Los métodos de la técnica anterior, sin embargo, no proporcionan una determinación cualitativa y cuantitativa fiable y reproducible de la identidad y potencia del fármaco asociado con una forma activada-potenciada. Esto incluye medicamentos activados preparados de acuerdo con las técnicas homeopáticas que se describen más arriba.

## 10 **Compendio de la invención**

Un método para determinar la actividad de la forma activada-potenciada de una primera sustancia, comprendiendo dicho método: proporcionar una forma activada-potenciada de una primera sustancia, asegurar la ausencia de la forma molecular de la sustancia en dicha forma activada-potenciada, proporcionar una forma molecular de una segunda sustancia  
15 (terapéutica) estructuralmente similar a la primera sustancia, medir al menos un parámetro físico, químico o biológico (A) de dicha forma molecular de dicha segunda sustancia utilizando un método analítico adecuado, tratar dicha forma molecular de dicha segunda sustancia con dicha forma activada-potenciada de dicha primera sustancia, y medir al menos el dicho parámetro físico, químico o biológico ( $A_M$ ) de dicha forma molecular tratada  
20 de dicha segunda 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  $A_M$ .

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

25 El método antes descrito, que comprende además i) tratar una forma molecular de una tercera sustancia con dicha forma activada-potenciada de la primera sustancia, ii) medir al menos el dicho parámetro físico, químico o biológico (B) de dicha forma molecular de dicha tercera sustancia con dicho método analítico, iii) medir al menos el dicho parámetro físico, químico o biológico ( $B_M$ ) de dicha forma molecular tratada de dicha tercera sustancia  
30 utilizando dicho método analítico para determinar la especificidad de dicho método, en donde dicho método es considerado específico cuando al menos el dicho parámetro físico, químico o biológico cambia de manera estadísticamente significativa para  $A - A_M$  y no cambia de manera estadísticamente significativa para  $B - B_M$ .

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

El método antes descrito, en donde dicho método analítico es un análisis de ensayo inmunoenzimático.

- 5 El método antes descrito, en donde dicho método analítico es Resonancia Magnética Nuclear.

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

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

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

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

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

El método antes descrito, en donde dicha forma activada-potenciada está impregnada sobre un portador sólido.

- 15 El método antes descrito, en donde dicha segunda sustancia es un receptor de la primera sustancia.

El método antes descrito, en donde dicha segunda sustancia es un anticuerpo contra la primera sustancia.

- 20 El método antes descrito, en donde dicha primera sustancia es un anticuerpo contra un antígeno y dicha segunda sustancia es un receptor de dicho antígeno.

El método antes descrito, en donde dicha primera sustancia es un anticuerpo contra un antígeno y dicha segunda sustancia es dicho antígeno.

El método antes descrito, en donde dicha primera sustancia es un anticuerpo contra un antígeno y dicha segunda sustancia es dicho antígeno.

- 25 El método antes descrito, en donde dicha segunda sustancia es una enzima catalizada por la primera sustancia.

### **Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 muestra alteraciones del desplazamiento químico en el IFN-gamma I cuando se añade un portador activado-potenciado en comparación con el placebo;

la FIG. 2 muestra alteraciones del desplazamiento químico en el IFN-gamma II cuando se añade un portador activado-potenciado en comparación con el placebo;

la FIG. 3 muestra alteraciones del desplazamiento químico en el IFN-gamma III cuando se añade un portador activado-potenciado en comparación con el placebo;

5 la FIG. 4 es una cinética del cambio a 323 nm del IFN-gamma-R1; y

la FIG. 5 es una cinética del cambio a 323 nm del IFN-gamma-R2.

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se define con referencia a las reivindicaciones anexas. Con respecto a las reivindicaciones, se han proporcionado anteriormente definiciones relevantes y en este  
10 apartado se proporcionan definiciones adicionales.

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente solicitud quiere decir una inmunoglobulina que específicamente se une a, y es por consiguiente definida como complementaria a, una organización espacial y polar particular de otra molécula. Los anticuerpos tal como se definen en las reivindicaciones pueden incluir una inmunoglobulina  
15 completa o fragmento de la misma, pueden ser naturales, policlonales o monoclonales, y pueden incluir diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de los mismos pueden incluir Fab, Fv y F(ab')<sub>2</sub>, Fab', y similares. El "anticuerpo" en singular incluye el plural "anticuerpos".

El término "biológicamente relacionado" con respecto a una primera sustancia y una  
20 segunda sustancia, en donde la primera sustancia es un anticuerpo, quiere decir que la segunda sustancia es un antígeno contra dicha primera sustancia, un receptor de dicha primera sustancia, un fragmento de un receptor contra dicha primera sustancia, y similares. Las sustancias biológicamente relacionadas son "estructuralmente similares" tal como se utilizan esos término en la presente solicitud. Es decir, un significado de "estructuralmente  
25 similar" es que las sustancias están biológicamente relacionadas. "Estructuralmente similar" también abarcan una sustancia de origen sintético o biológico que interacciona con la sustancia original, o una sustancia capaz de interaccionar con las mismas moléculas de origen sintético o biológico que son capaces de interaccionar con la sustancia original.

Los términos "forma activada-potenciada" o "forma potenciada", se utilizan para denotar un  
30 producto de la potenciación homeopática de cualquier solución inicial que contiene una forma molecular de una sustancia, por ejemplo, un anticuerpo. Se describen ejemplos de potenciación homeopática de anticuerpos en las patentes de EE.UU. Nos. 7.572.441 y

7.582.294, las cuales se incorporan por referencia a la presente solicitud 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 la técnica homeopática. 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.

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 evidenciar la actividad. En particular con respecto a las formas moleculares que consisten en anticuerpos, ha sido sorprendentemente descubierto por el inventor de la presente solicitud y ampliamente demostrado en los modelos farmacológicos aceptados que el disolvente finalmente obtenido de la dilución múltiple consecutiva de una forma molecular de partida de un anticuerpo tiene actividad definitiva no relacionada con la presencia de trazas de la forma molecular del anticuerpo en la dilución objetivo. También, la forma “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 partida, inicial. En otras palabras, aunque se contempla que la forma “activada-potenciada” del anticuerpo puede contener trazas de la forma molecular inicial del anticuerpo, una persona experta en la técnica 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.

Aunque la invención no está limitada por ninguna teoría específica, la actividad biológica de la forma “activada-potenciada” de los anticuerpos de la presente invención no es atribuible a la forma molecular inicial de la sustancia. 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

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.

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

10 La composición farmacéutica combinada 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 del fármaco de combinación de acuerdo con la presente invención es el uso de la mezcla de tres diluciones acuosas-alcohólicas de la solución 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 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 un anticuerpo, se hace de este modo en un proceso aceptado en la técnica de la homeopatía. Los anticuerpos de partida pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales preparados de acuerdo con procesos conocidos, por ejemplo, tal como se describe en *Immunotechniques*, G. Frimel, M., "Meditsyna", 1987, p. 9-33; "Hum. Antibodies. Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after" por Laffly E., Sodoyer R. – 2005 – Vol. 14. – N 1-2. P.33-55, ambos incorporados a la presente solicitud por referencia.

30 Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener, por ejemplo, por medio de la tecnología de los 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 los mismos métodos que 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 partida para la preparación de la forma activada-potenciada de los anticuerpos. La concentración preferida de la solución inicial resultante de anticuerpo en el disolvente, 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 en anticuerpos policlonales contra el 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 compleción 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  $\text{NaN}_3$  (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  $\text{NaN}_3$  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:

- 10 ml del antisuero de los conejos es diluido dos veces con 0,15 M de NaCl, después de lo cual se agrega 6,26 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se mezcla e incuba durante 12-16 horas a 4°C. El sedimento es retirado 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 de que el sedimento es retirado, 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.

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

- 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 matriz inicial de los anticuerpos de conejo policlonales de antígeno purificado contra el receptor CD4 es de 0,5 a 5,0 mg/ml, preferiblemente, 2,0 a 3,0 mg/ml.

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, sacarosa, maltosa, almidón, isomaltosa, isomalta y otros mono-, oligo- y polisacáridos 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 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.

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 contra 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 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.

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.

El resultado tecnológico que busca la invención reivindicada es la fiabilidad 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 fiabilidad y reproducibilidad incrementadas de los 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.

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 una sustancia de partida que contiene una 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 la concentración de la sustancia de partida.

La potencia de la forma activada-potenciada se manifiesta en su habilidad para alterar o afectar las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de una dosis terapéutica de una sustancia diferente. La dosis terapéutica contiene moléculas similares a la estructura de las moléculas de la sustancia de partida usadas para preparar la forma activada-potenciada. La invención reivindicada involucra determinar las alteraciones en los parámetros físicos de la dosis terapéutica utilizando métodos analíticos tras añadir a la misma una forma activada-potenciada de una sustancia estructuralmente similar. 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 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 métodos analíticos. Las alteraciones de un parámetro característico se pueden proporcionar en unidades relativas.

La medición de un parámetro característico puede verse 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 removidas de la forma activada-potenciada antes de mezclar la forma activada-potenciada y la dosis terapéutica. La ausencia de la forma 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 la retirada/transformación de una forma molecular no detectable 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 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 remover o transformar 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 durante al menos cierto periodo de tiempo conocido.

Adicionalmente, si están presentes moléculas de la sustancia de partida en el portador  
5 activado-potenciado, se pueden retirar utilizando métodos bien aceptados. En particular, las moléculas de una proteína tomada como la sustancia de partida pueden ser retiradas, por ejemplo, calentando el portador activado-potenciado 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  
10 sales neutras de metales alcalinos y alcalino-térreos 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 la técnica, refiérase a B.M. Steward, *The production of high-purity water in the clinical laboratory*,  
15 *Laboratory Medicine*, vol. 31(11), pp. 605- 611 (2000); J. Grimm, D. Bessarabov, R. Sanderson, *Review of electro-assisted method for water purification*, *Desalination*, vol. 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*, Vol. 54, pp. 932-937 (1998); Labconco Corporation, *A Guide to Laboratory Water  
20 Purification*, An Industry Service Publication. <http://bioresearchonline.com>. Cada una de las publicaciones anteriores se incorpora por referencia a la presente solicitud para los propósitos señalados.

El método reivindicado puede ser llevado a cabo utilizando diferentes métodos de  
25 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"); espectroscopía RMN, ensayo inmunoenzimático ("IEA").

30 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 del disolvente (generalmente 3-5  $\mu\text{m}$ ; actualmente es hasta 1,8  $\mu\text{m}$ ) son características distintivas de la HPLC. La determinación

cualitativa utilizando 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.

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 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 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.

Un ensayo inmunoenzimático (“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 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 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 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<sup>ra</sup> edición (2004); Vasilyev,

V.P., *Analytical chemistry*, (1989); Otto, M., *Up-to-date methods of analytical chemistry*, (2003).

Utilizando una combinación de métodos analíticos para detectar las moléculas de la sustancia de partida en dicho portador activado-potenciado y la medición por métodos analíticos de al menos un parámetro característico de la sustancia terapéutica antes y después de su interacción con dicho portador activado-potenciado, demostramos (sustanciamos) que: primero, la actividad modificadora asociada con el portador no debe ser atribuida a la presencia de moléculas de la sustancia de partida 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 partida; en segundo lugar, el portador activado-potenciado se obtiene mediante el uso de la sustancia de partida, en donde la forma activada-potenciada está asegurada por el mismo procedimiento empleado durante el tratamiento tecnológico de la sustancia de partida y que está representado por múltiples reducciones en serie de la concentración de esta 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 fármaco preparado utilizando dicho portador activado-potenciado. Esto es, comenzando con una forma molecular a una concentración fácilmente medible se obtiene 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 al menos un parámetro característico de la forma terapéutica antes de su interacción con 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 potencia modificadora que corresponde a una forma activada-potenciada se 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);

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

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

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

5

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 alto 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  $\mu\text{m}$ ; aquí hasta 1,8  $\mu\text{m}$ ) 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.

10

15

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 electromagnética por las sustancias con núcleos de espín nulo cuando se colocan en un campo magnético externo a una frecuencia  $\nu$  (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 señal analítica está representada por una diferencia en la frecuencia de resonancia del resonador piezoeléctrico ( $\Delta f$ ) 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 analytical chemistry (2 volúmenes), Textbook for universities, 3<sup>ra</sup> edición, revisada y complementada: Vysshaya shkola Publisher (2004); Vasilyev, V.P., Analytical chemistry,

20

25

30

(1989); Otto, M., Up-to-date methods of analytical chemistry, (2003).

Adicionalmente, si están presentes moléculas de la sustancia de partida en el portador activado-potenciado, pueden ser removidas utilizando métodos bien aceptados. En particular, las moléculas de una proteína tomada como la sustancia de partida pueden ser retiradas, por ejemplo, calentando el portador activado-potenciado 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 alcalinos y alcalino-térreos seguida por 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 la técnica, refiérase a, B.M. Steward, The production of high-purity water in the clinical laboratory //Laboratory Medicine, 2000, V. 31(11), P. 605- 611; J. Grimm, D. Bessarabov, R. Sanderson, Review of electro-assisted methods for water purification //Desalination. – 1998. V. 115 (3) - P. 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. 54 - P. 932-937; Labconco Corporation, A guide to laboratory water purification, An Industry Service Publication. Se encuentra en <http://bioresearchonline.com>. Cada una de las publicaciones anteriores se incorpora por referencia a la presente solicitud para los propósitos señalados.

Al utilizar una combinación de métodos analíticos para detectar las moléculas de la sustancia de partida en dicho portador activado-potenciado y la medición por métodos analíticos de al menos un parámetro característico de la sustancia terapéutica antes y después de su interacción con dicho portador activado-potenciado, demostramos (sustanciamos) que: primero, la actividad modificadora asociada con el portador no debe ser atribuida a la presencia de las moléculas de la sustancia de partida y que las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de dicho portador difieren de las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la sustancia terapéutica, en segundo lugar, el portador activado-potenciado es obtenido mediante el uso de la sustancia de partida, en donde la forma activada-potenciada se logra a través del mismo procedimiento empleado durante el tratamiento tecnológico de la sustancia de partida, es decir, múltiples reducciones en serie de la concentración de esta 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 fármaco preparado utilizando dicho portador activado-potenciado.

Además, la medición analítica reivindicada de al menos un parámetro característico de la sustancia terapéutica 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).

5 Para determinar el grado 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 partida mediante múltiples etapas de reducción en serie de la concentración utilizando dicho portador,  
10 en donde el último no contiene la forma molecular de dicha sustancia de partida.

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

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

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

iii medición analítica de al menos un parámetro físico, químico y/o biológico característico de dicha forma molecular de la sustancia terapéutica (A) y dicha combinación del párrafo b.) i.) ( $A_M$ ), en donde dicho portador modifica específicamente el efecto-capacidad de modificar las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la sustancia terapéutica se considera específica de 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.))  
20

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

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

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

### 30 Ejemplos

La presente invención se ilustra ahora por medio de los siguientes Ejemplos, los cuales no

limitan el alcance de la presente invención en ningún sentido.

#### Ejemplo 1

El propósito del Ejemplo 1 es determinar el grado de potencia modificadora de la forma activada-potenciada de un anticuerpo ("Ab") de conejo contra el interferón-gamma ("IFN-gamma") humano. Partiendo de una solución madre de Ab de conejo contra el IFN-gamma humano, se preparó una forma activada-potenciada de Ab de conejo contra IFN-gamma humano mediante múltiples diluciones consecutivas disminuyendo la concentración de la sustancia de partida acompañada por múltiples agitaciones intermedias. El diluyente, es decir, el portador, fue una solución agua-alcohol. La forma molecular se diluyó en 100<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup> y 100<sup>50</sup> 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 partida, es decir, el Ab de conejo contra el IFN-gamma humano, se utilizaron espectroscopía y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

Tal como se discutió anteriormente, los mismos núcleos atómicos en diferentes ambientes moleculares demuestran señales de RMN diferentes. La diferencia de dicha señal con respecto a la señal de la sustancia estándar hace posible la detección del llamado desplazamiento químico causado por la composición química de la sustancia en estudio, lo que se utilizó como parámetro característico que refleja información sobre la fórmula molecular de una sustancia.

Para determinar cambios conformacionales en el IFN-gamma, se añadió al IFN-gamma una sustancia que contenía moléculas con estructura similar al Ab de conejo contra el IFN-gamma humano afectado por un portador activado-potenciado (abreviado algunas veces "AC") y se aplicó espectroscopía de RMN. Como placebo se utilizaron diluciones activas de liberación de agua purificada.

Para preparar las muestras de prueba se mezclaron el placebo o la forma activada-potenciada del Ab contra el IFN-gamma con una solución de Ab contra el IFN-gamma en una relación 2:1 a la que la concentración final de Ab contra IFN-gamma en cada muestra fue 0,8 mg/ml.

Los experimentos de RMN se llevaron a cabo a 25°C en un espectrómetro Bruker Avance de 900 MHz, equipado con una criosonda de 5 mm, resonancia triple y gradiente a lo largo de eje Z. Se añadieron AC o placebo a IFN-gamma 50 µM marcado con <sup>15</sup>N solvatado en 180 µl de tampón con fosfato de potasio 20 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 20 mM y D<sub>2</sub>O al 10%.

Los espectros se obtuvieron utilizando una secuencia de pulsos HSQC con 2048 escaneos en la dimensión del protón y 34 escaneos en la dimensión del nitrógeno con un retraso D1 de 1 seg. La adquisición de datos se llevó a cabo utilizando el software Topspin Versión 3.0. Los espectros se procesaron y analizaron utilizando el software NMRView y Sparky. Las resonancias observadas en los esqueletos se asignaron utilizando datos de RMN previamente publicados, obtenidos en condiciones similares para el IFN-gamma.

Las alteraciones del desplazamiento químico en el IFN-gamma cuando se añadió AC o placebo se presentan en la Figura 1 en donde:

- 10 - En la fila superior señales  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -HSQC de los espectros del IFN-gamma en tampón fosfato (pH 6,0); en ausencia de AC de Ab contra IFN-gamma tienen forma esférica mientras que en presencia de AC de Ab contra IFN-gamma tienen forma ovalada, el espectro a tamaño completo (de 6,5 a 9,5 partes por millón) se indica como I mientras que las regiones que contienen señales fuertemente perturbadas están expandidas y se indican como II y III;
- 15 - En la fila inferior señales  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -HSQC de los espectros del IFN-gamma en tampón fosfato (pH 6,0); en ausencia de placebo tienen forma esférica mientras que en presencia de placebo tienen forma ovalada, el espectro a tamaño completo (de 6,5 a 9,5 partes por millón) se indica como I mientras que las regiones que contienen señales fuertemente perturbadas están expandidas y se  
20 indican como II y III.

Sólo la adición a IFN-gamma de la forma activada-potenciada del Ab contra el IFN-gamma indujo alteraciones pronunciadas del desplazamiento químico en el espectro general. En el fondo de añadir AC del Ab contra IFN-gamma a 50  $\mu\text{m}$  de IFN-gamma, se observaron alteraciones del desplazamiento químico para los residuos A9, E39, E40, D42, Q47, 150, F82, F83, S85, A119 y E120. Además las señales correspondientes a los residuos 145 y 117 y muchos picos no detectados o desaparecieron o alteraron completamente su posición. Es más hubo *señal heterogénea en el rango de aproximadamente 7-8,5 ppm en la dimensión H, lo que prueba la formación de nuevas conformaciones* de IFN-gamma. La adición al IFN-gamma de la forma activada-potenciada del Ab contra IFN-gamma también indujo la expansión del espectro HSQC lo que indica alteración de alteraciones generales de la molécula en presencia de diluciones RA de Ab contra IFN-gamma. Añadir el AC del Ab contra el receptor del IFN-gamma así como añadir el placebo no afectó a la conformación del IFN-gamma (estos datos no están reflejados en la Figura).

Muestra	Número de picos relacionados con IFN-gamma antes de añadir las muestras de prueba correspondientes.	Número de picos relacionados con IFN-gamma ,cuya posición en el espectro general no varió tras añadir las muestras de prueba correspondientes.	Potencia modificadora de sustancia en UA a C=100
IFN-gamma+AC de Ab contra IFN-gamma	128	117	8,6
IFN-gamma+AC de Ab contra receptor de IFN-gamma	128	128	-
IFN-gamma+AC del agua	128	128	-

Los estudios mostraron que sólo añadir la forma activada-potenciada del Ab contra IFN-gamma afectó a la conformación del IFN-gamma. Disolver la Fórmula (1) tomando C=100 y donde A=128;  $A_M = 113$  proporciona:

5 
$$X = 100 |128 - 113| / 128)$$

Así, X=8,6 UA

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 partida;

10

2. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas del IFN-gamma, cuya estructura es similar a la estructura de las moléculas del Ab contra IFN-gamma, tratadas con la forma activada-potenciada del Ab contra el IFN-gamma, presentan evidencias fiables de que dicha forma activada-potenciada se prepara sobre la base de la sustancia de partida IFN-gamma;

15

3. Las alteraciones de las propiedades físicas y químicas del IFN-gamma tratado

mediante la forma activada-potenciada del Ab contra el IFN-gamma, validan de manera significativa el grado de potencia modificadora asociada con la forma activada-potenciada y proporcionan una oportunidad para expresar dicha potencia modificadora asociada con el portador activado-potenciado revelada mediante la utilización de espectroscopia de RMN en unidades de actividad adimensional como  $X = 8,6$  UA.

## Ejemplo 2

El Ejemplo 2 implica la obtención de derivados de cisteína. Los cambios en la conformación del IFN-gamma-R1, IFN-gamma-R2 en presencia de la forma activada-potenciada del Ab contra IFN-gamma se evaluaron utilizando sondas biológicas. Un modo simple y muy específico de introducir sondas biológicas es a través de la mutagénesis de cisteína seguida de la reacción con agentes de derivación que portan el grupo funcional a investigar con el propósito de probar su entorno. El grupo sulfhidrilo libre de la cisteína es apropiado para la derivación química con diferentes agentes que puedan entonces ser caracterizados mediante diferentes métodos espectroscópicos. Aquí, se empleó la estrategia de la accesibilidad de la cisteína a través de medidas de absorbancia. Así, las tasas de reacción entre cisteínas en el IFN-gamma, IFN-gamma-R1 e IFN-gamma-R2 con un agente de derivación de la cisteína se cuantificaron como indicadores de la conformación.

La comprobación de la conformación del tipo silvestre IFN-gamma-R1 e IFN-gamma-R2 comienza en la etapa 1, que es la preparación de 500  $\mu$ l de solución de IFN-gamma-R1 e IFN-gamma-R2 eluida de la columna con la concentración final de IFN-gamma-R1, IFN-gamma-R2 obtenida a la concentración máxima obtenida de las eluciones. La solución se preparó en tampón (fosfato de sodio 2 mM y DM al 0,05% a pH 6). Las pruebas de control implican la preparación de 500  $\mu$ l de solución tampón (fosfato de sodio 2 mM y DM al 0,05% a pH 6). La etapa 2 implica obtener un espectro de absorbancia. La etapa 3 es añadir 4-PDS a todas las cubetas de una solución madre 10 mM para dar una concentración final de 25  $\mu$ M y mezclarlo por completo. La etapa 4 es registrar el espectro de absorbancia cada 10 min hasta que el pico de absorbancia a 323 nm se satura. Los espectros de las diferencias se obtuvieron restando el espectro de absorbancia de la proteína sola en presencia y ausencia de 4-PDS para obtener el cambio en la absorbancia a 323 nm. El número de cisteínas reaccionantes con 4-PDS por molécula de IFN-gamma-R1 o IFN-gamma-R2 no se estimó debido a la incertidumbre en la cantidad de IFN-gamma-R1 o IFN-gamma-R2 presente en la solución.

Ahora se puede efectuar la comprobación del efecto del IFN-gamma en la conformación del receptor. La etapa 1 implica en ensayo de las muestras, que comienza con la preparación

de 400  $\mu$ l (PBS + DM 0,05% + 70  $\mu$ M nonapéptido + 25  $\mu$ M de 4-PDS) + 50  $\mu$ l de IFN-gamma-R1 o IFN-gamma-R2 + 50  $\mu$ l de IFN-gamma (concentración final de 0,04  $\mu$ g/ $\mu$ l), y el ensayo del control para el cual se prepararon 450  $\mu$ l (PBS + DM 0,05% + 70  $\mu$ M nonapéptido + 25  $\mu$ M de 4-PDS) + 50  $\mu$ l de IFN-gamma-R1 o IFN-gamma-R2 y 450 l (PBS + DM 0,05% + 70  $\mu$ M nonapéptido + 25  $\mu$ M de 4-PDS) + 50  $\mu$ l de IFN-gamma (concentración final de 0,04  $\mu$ g/ $\mu$ l). En la etapa 2 se obtuvo un espectro de absorbancia. En la etapa 3 se añadió 4-PDS a todas las cubetas a partir de una solución madre 10 mM para dar una concentración final de 25  $\mu$ M y se mezcló por completo. En la etapa 4 se registró el espectro de absorbancia cada 10 min hasta que el pico a 323 nm se saturó.

10 Los espectros de las diferencias se obtuvieron restando el espectro de absorbancia de la proteína sola en presencia o ausencia de 4-PDS para obtener el cambio en la absorbancia a 323 nm. El número de cisteínas reaccionantes con 4-PDS por molécula de IFN-gamma-R1 o IFN-gamma-R2 no se estimó debido a la incertidumbre en la cantidad de IFN-gamma-R1 o IFN-gamma-R2 presente en la solución.

15 La comprobación del efecto de la forma activada-potenciada de Abs contra IFN-gamma en la conformación del receptor comienza con la etapa 1, confirmación de IFN-gamma-R1 o IFN-gamma-R2 preparando 400  $\mu$ l (PBS + DM 0,05% + 70  $\mu$ M nonapéptido + 25  $\mu$ M de 4-PDS) + 50  $\mu$ l IFN-gamma-R1 + 50  $\mu$ l de la forma activada-potenciada de Abs contra IFN-gamma. Para el control, se prepararon 450  $\mu$ l (PBS + DM 0,05% + 70  $\mu$ M nonapéptido + 25  $\mu$ M de 4-PDS) + 50  $\mu$ l de forma activada-potenciada de Abs contra IFN-gamma y 450  $\mu$ l (PBS + DM 0,05% + 70  $\mu$ M nonapéptido + 25  $\mu$ M de 4-PDS) + 50  $\mu$ l de IFN-gamma-R1. En la etapa 2 se premezclaron los componentes en un tubo Eppendorf antes de transferirlos a la cubeta. La etapa 3 es obtener un espectro de absorbancia. En la etapa 3, se añadió 4-PDS a todas las cubetas de una solución madre 10 mM para dar una concentración final de 25  $\mu$ M y se mezcló por completo. La etapa 5 implica registrar el espectro de absorbancia cada 10 min hasta que el pico de absorbancia a 323 nm se saturó.

Los espectros de las diferencias se obtuvieron restando el espectro de absorbancia de la proteína sola en presencia y ausencia de 4-PDS para obtener el cambio en la absorbancia a 323 nm. El número de cisteínas reaccionantes con 4-PDS por molécula de IFN-gamma-R1 o IFN-gamma-R2.

Los resultados se representan en las FIGS. 4 y 5. Cinética de cambio a 323 nm para IFN-gamma-R1 (FIG. 4), IFN-gamma-R2 (FIG. 5). Registro del espectro de absorbancia cada 10 min hasta que se saturó el pico de absorbancia a 323 nm. Los espectros de las diferencias se obtuvieron restando el espectro de absorbancia de o IFN-gamma-Cys, IFN-gamma-R1,

IFN-gamma-R2, o IFN-gamma, IFN-gamma-R1-Cys, IFN-gamma-R2, o IFN-gamma, IFN-gamma-R1, IFN-gamma-R2-Cys solo en presencia y ausencia de 4-PDS para obtener el cambio en la absorbancia a 323 nm. Ab1 – es la forma activada-potenciada de Abs contra IFN-gamma.

- 5 Así, se demostró que la forma activada-potenciada de Abs contra el IFN-gamma da lugar a un cambio conformacional en el complejo del receptor, como se evidenció por los cambios estructurales en los reporteros conformacionales unidos a las cisteínas en el dominio citoplásmico tanto del IFN-gamma-R1 e IFN-gamma-R2, purificados y solubilizados en micelas de detergente. Los cambios conformaciones en los receptores se vieron incluso en  
 10 ausencia de IFN-gamma, lo que indica que la forma activada-potenciada de Abs contra el IFN-gamma tiene efectos en sus receptores directamente.

Ejemplo 3

El Ejemplo 3 implica el ensayo con la enzima COX-1. El Ejemplo 3 prueba el efecto de preincubar la forma activada-potenciada del Diclofenac con la enzima ciclooxigenasa tipo 1  
 15 (COX-1) en la posibilidad del Diclofenac de inhibir la actividad específica de la enzima COX-1. Como placebo se usó la forma activada-potenciada del agua destilada.

Se preincubó una concentración única de cada una de las dos muestras de ensayo (forma activada-potenciada del Diclofenac o del placebo) con la mezcla enzimática a temperatura ambiente (RT) durante 1 hora. Después de esto, se añadió Diclofenac a la concentración de  
 20  $10^{-7}$  M ( $IC_{50}$ ) a la enzima pre-incubada y se realizó una segunda pre-incubación durante 5 minutos a RT. Entonces se añadió ácido araquidónico para iniciar la reacción, y se leyó la  $DO_{590}$  después de 5 minutos a RT y se midió la densidad óptica (DO) en un lector de placas Perkin Elmer Victor 2 a 590 nm (por favor compruébese la tabla 1).

Tabla 1. Esquema del experimento

<i>Número de pocillos de réplica = 3</i>	<i>Número de pocillos de réplica = 3</i>
<b>Muestra de prueba</b>	<b>Control #1</b>
<b>Estadio 1.</b> 130 µl de enzima “Master Mix” (tampón, hemo, enzima – COX-1) + 20 µl de muestra de prueba	<b>Estadio 1.</b> 130 µl de enzima “Master Mix” (tampón, hemo, enzima – COX-1) + 20 µl de control
<b>Estadio 2.</b> Incubación a RT durante 1 hora	
<b>Estadio 3.</b> 20 µl de Diclofenac ( $10^{-7}$ M, $IC_{50}$ ) se añadirán al pocillo	

<b>Estadio 4.</b> Incubación a RT durante 5 minutos
<b>Estadio 5.</b> Añadir 20 µl del sustrato colorimétrico TMPD (N,N,N,'N'-tetrametil-p-Fenilenediamina) mantenido en hielo
<b>Estadio 6.</b> Iniciar la reacción mediante la adición de 10 µl de ácido araquidónico (concentración final 50 µM)
<b>Estadio 7.</b> Incubar durante 3 min a RT y leer a 590 nm (Lector de placas Perkin Elmer Victor II)

Se demostró que la preincubación de la fuente de enzima (COX-1) con la forma activada-potenciada del Diclofenac durante 1 hora antes de añadir Diclofenac y su posterior incubación durante 5 minutos dieron como resultado elevar la capacidad inhibidora del Diclofenac en comparación con el placebo: 78% frente a 34%.

La descripción, ejemplos y dibujos contenidos en la presente solicitud representan la realización actualmente preferida de la invención y son, como tales, representativos de la materia que está ampliamente contemplada mediante la presente invención. El alcance de la presente invención abarca por completo otras realizaciones que pueden resultar obvias para los expertos en la materia, y el alcance de la presente invención, en consonancia, no está limitado por nada más que por las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la actividad de la forma activada-potenciada de una sustancia, comprendiendo dicho método:

a) proporcionar una forma activada-potenciada de una primera sustancia,

5 b) asegurar la ausencia de la forma molecular de la sustancia en dicha forma activada-potenciada,

c) proporcionar una forma molecular de una segunda sustancia estructuralmente similar a dicha primera sustancia ,

10 d) medir al menos un parámetro físico, químico o biológico (A) de dicha forma molecular utilizando un método analítico adecuado,

e) tratar dicha forma molecular con dicha forma activada-potenciada, y

15 f) medir al menos el dicho parámetro físico, químico o biológico ( $A_M$ ) de dicha forma molecular tratada utilizando dicho método analítico, en donde 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 en unidades relativas (X) de acuerdo con la fórmula  $X = C |A - A_M| / A$ , donde C es una constante adimensional de proporcionalidad que es  $C=10^k$ , donde k es un número entero de la secuencia 1, 2, 3, etc..

20 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 al menos el dicho parámetro físico, químico o biológico (B) de dicha forma molecular de dicha sustancia diferente usando dicho método analítico, iii) medir al menos el dicho parámetro físico, químico o biológico ( $B_M$ ) de dicha forma molecular  
25 tratada de dicha sustancia diferente utilizando dicho método analítico para determinar la especificidad de dicho método, en donde dicho método se considera específico cuando dicho al menos el dicho parámetro físico, químico o biológico cambia de modo estadísticamente significativo para  $A - A_M$  y no cambia de modo estadísticamente significativo para  $B - B_M$ .

30 4. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho método analítico es cromatografía líquida de alto desempeño.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho método analítico es análisis de ensayo inmunoenzimático.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho método analítico es resonancia magnética nuclear.

5 7. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde 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, en donde dicha sustancia es un anticuerpo.

10 9. El método de conformidad con la reivindicación 8, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

10. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha sustancia es una molécula orgánica pequeña.

15 11. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha forma activada-potenciada es un líquido.

12. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha forma activada-potenciada está impregnada sobre un portador sólido.

13. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha segunda sustancia es un receptor de la primera sustancia.

20 14. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha segunda sustancia es un anticuerpo contra la primera sustancia.

15. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha primera sustancia es un anticuerpo contra un antígeno y dicha segunda sustancia es un receptor de dicho antígeno.

25 16. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha primera sustancia es un anticuerpo contra un antígeno y dicha segunda sustancia es dicho antígeno.

17. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha segunda sustancia es una enzima catalizada por la primera sustancia.

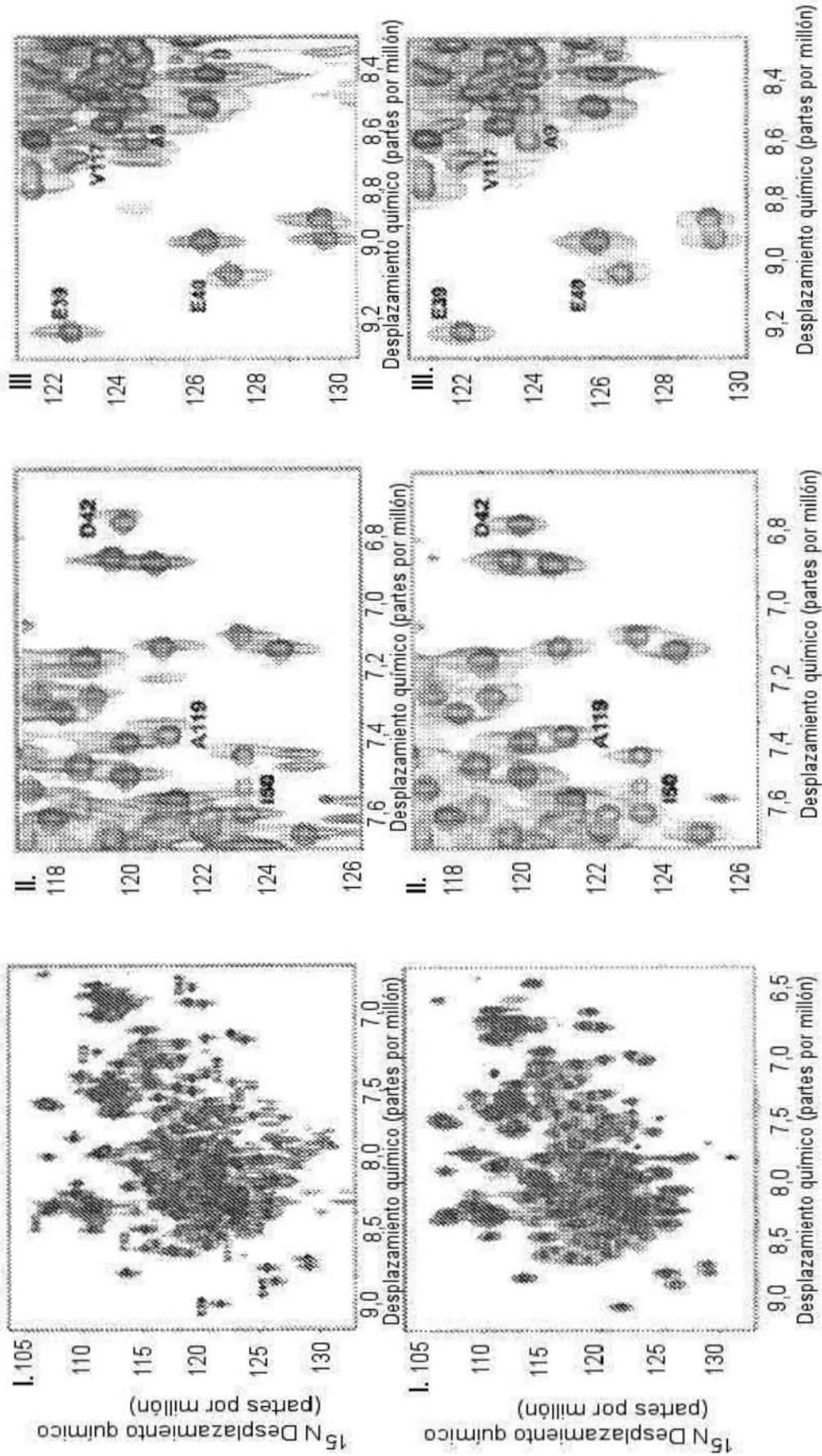


FIG. 1

FIG. 2

FIG. 3

Reacción de grupos SH en IFNgR1 con 4-PDS en diferentes condiciones

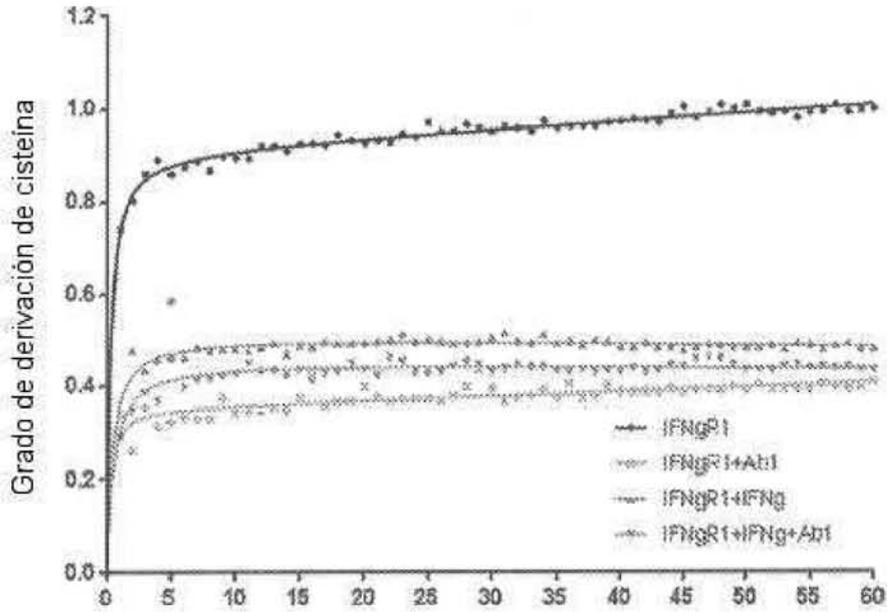


FIG. 4

Reacción de grupos SH en IFNgR2 con 4-PDS en diferentes condiciones

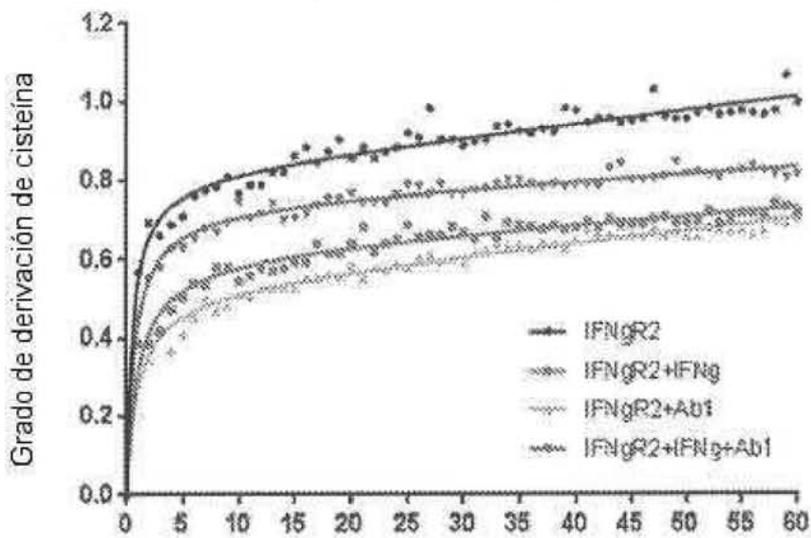


FIG. 5