

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-512893

(P2016-512893A)

(43) 公表日 平成28年5月9日(2016.5.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88	J
GO 1 R 33/32 (2006.01)	GO 1 N 24/02	530K

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2016-503731 (P2016-503731)	(71) 出願人	513008959 オレグ イリイチ・エプシテイン ロシア共和国 127473 モスクワ ケープイ. 72 ディー. 3 サモチョク ニー パー 4
(86) (22) 出願日	平成26年3月18日 (2014. 3. 18)	(74) 代理人	100107515 弁理士 廣田 浩一
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月6日 (2015. 11. 6)	(74) 代理人	100107733 弁理士 流 良広
(86) 国際出願番号	PCT/IB2014/001183	(74) 代理人	100115347 弁理士 松田 奈緒子
(87) 国際公開番号	W02014/155206	(74) 代理人	100163038 弁理士 山下 武志
(87) 国際公開日	平成26年10月2日 (2014. 10. 2)		
(31) 優先権主張番号	2013111962		
(32) 優先日	平成25年3月18日 (2013. 3. 18)		
(33) 優先権主張国	ロシア (RU)		

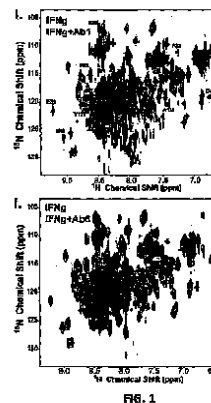
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医薬の調節効力の程度を測定する方法

(57) 【要約】

本発明は、医薬の調節効力の程度を測定する方法を含む。医薬は、治療成分とホメオパシー成分、即ち、活性化増強成分を含む医薬であって、前記活性化増強成分が、前記治療成分及び/又はその薬効に対して何らかの物理的、化学的、又は生物学的作用を有する医薬である。治療成分は、ホメオパシー成分の出発物質と生物学的に関連している。活性化増強型と相互作用する前に、治療型の少なくとも1つの特徴的なパラメータの分析測定を行う。治療型と活性化増強型との相互作用後にも同じ分析測定を行う。このデータを用いて、任意の調節された効力の存在が、活性化増強型中の分子型の存在によって引き起こされることを確認する。更に、活性化増強型と相互作用する前及び再度かかる相互作用後に治療型の少なくとも1つの特徴的なパラメータを請求の通り分析測定することは、活性化増強型に関連する調節効力の程度を相対無次元活性単位（放出活性）で定量するのに役立つ。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

物質の活性化増強型の活性を測定する方法であって、

a . 第 1 の物質の活性化増強型を提供する工程と、  
b . 前記活性化増強型中に前記第 1 の物質の分子型が存在しないことを保証する工程と、

c . 前記第 1 の物質と構造的に類似している第 2 の物質の分子型を提供する工程と、

d . 好適な分析方法を用いて、前記分子型の少なくとも 1 つの物理的パラメータ、化学的パラメータ、又は生物学的パラメータ ( A ) を測定する工程と、

e . 前記分子型を前記活性化増強型で処理する工程と、

f . 前記分析方法を用いて、処理された前記分子型の前記少なくとも 1 つの物理的パラメータ、化学的パラメータ、又は生物学的パラメータ ( A<sub>M</sub> ) を測定する工程であって、前記物質の活性化増強型の活性が、A と A<sub>M</sub> との差の程度である工程と

を含むことを特徴とする方法。

## 【請求項 2】

式  $X = C | A - A_M | / A$  に従って、前記活性化増強型の活性を相対単位 ( X ) で表すことを更に含む請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

i ) 第 1 の物質の活性化増強型で異なる物質の分子型を処理する工程と、i i ) 前記分析方法を用いて、前記異なる物質の分子型の前記少なくとも 1 つの物理的パラメータ、化学的パラメータ、又は生物学的パラメータ ( B ) を測定する工程と、i i i ) 前記分析方法を用いて、処理された前記異なる物質の分子型の前記少なくとも 1 つの物理的パラメータ、化学的パラメータ、又は生物学的パラメータ ( B<sub>M</sub> ) を測定して、前記方法の特異性を測定する工程とを更に含み、前記少なくとも 1 つの物理的パラメータ、化学的パラメータ、又は生物学的パラメータが、A - A<sub>M</sub> については統計的に有意に変化するが、B - B<sub>M</sub> については統計的に有意に変化しない場合、前記方法が特異的であるとみなす請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記分析方法が、高速液体クロマトグラフィーである請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記分析方法が、酵素免疫アッセイ分析である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記分析方法が、核磁気共鳴である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記物質の分子型が存在しないことを保証する工程が、前記物質の分子型を除去することを含む請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記物質が、抗体である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記抗体が、ポリクローナル抗体である請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記物質が、有機小分子である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記活性化増強型が、液体である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記活性化増強型が、固体担体に含浸している請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記第 2 の物質が、前記第 1 の物質の受容体である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記第 2 の物質が、前記第 1 の物質に対する抗体である請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 15】

前記第1の物質が、抗原に対する抗体であり、前記第2の物質が、前記抗原の受容体である請求項1に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記第1の物質が、抗原に対する抗体であり、前記第2の物質が、前記抗原である請求項1に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記第1の物質が、抗原に対する抗体であり、前記第2の物質が、前記抗原である請求項1に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記第2の物質が、前記第1の物質によって触媒される酵素である請求項1に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本願は、2013年3月18日出願の露国特許出願第2013111962号に対する優先権を主張し、その全文を参照によって本明細書に援用する。

## 【0002】

本発明は、医学の分野、具体的には、医薬品に関する。本発明は、薬物、特に、そのうちの少なくとも1つの成分がホメオパシー技術に従って調製される薬物の調節効力を、確

10

20

## 【背景技術】

## 【0003】

活性化増強型

ホメオパシー技術に従って調製される医薬は、担体（水又は水-アルコール溶媒）で複数回連続希釈して濃度を低下させるのと併せて各連続希釈物を振盪することを介して、ホメオパシー増強（活性化とも呼ばれる）によって調製されるものを含む。例えば、特許文献1～4を参照。ホメオパシー増強による調製の結果、低用量又は超低用量の初期医薬を含有する医薬が得られ；1モル当たりの合計分子数がアボガドロ数（ $6.022 \times 10^{23}$ モル<sup>-1</sup>）によって与えられることに留意して、分子型の初期医薬1分子当たり担体が約1モル又は1モル超になるまで希釈を行ってよい。分子型という用語については、以下に更に定義する。固体の場合、希釈を研和と呼ぶ。ホメオパシー技術を通して、担体は、調節効力を獲得することができ、この効力は、活性化増強型によって処理したときに出発物質の物理的、化学的、及び/又は生物学的性質を変化させる能力に現れる（特許文献5）。活性化増強担体は、前記活性化増強型によって処理したときに出発物質の分子の構造に類似する分子を含有する物質の物理的、化学的、及び/又は生物学的性質を変化させる調節能を獲得することができる。

30

## 【0004】

用語「分子型」は、特定の化学物質の1以上の分子を示すために用いられる。したがって、分子型のアスピリンは、1分子のアセチルサリチル酸であってよく；分子型のアスピリン1モルは、 $6.022 \times 10^{23}$ 分子のアセチルサリチル酸からなり、重量は180.157グラムである。

40

## 【0005】

用語「活性化増強型」は、物質の分子型を含む最初の溶液のホメオパシーポテンタイゼーション（potentization）の生成物を示すために用いられる。言い換えれば、物質の分子型、例えば、特定の抗体又は有機分子を含有する溶液を、ホメオパシー技術に従って繰り返し連続希釈し、得られた各溶液を複数回上下に振盪する。担体と呼ばれることが多い好ましい希釈剤は、水又は水-エチルアルコール混合物である。初期担体中の分子型の好ましい濃度は、約0.5mg/mL～約5.0mg/mLである。活性化増強型は、好ましくは、それぞれの直前の溶液1部を段階希釈することによって比例的に濃

50

度を低下させる方法を用いて、ホメオパシー増強によって初期溶液から調製することができる。したがって、初期溶液1部を担体99部(100倍希釈の場合)と混合し、外部衝撃に供する。好ましくは、外部衝撃は、各希釈物を複数回上下に振盪する(ダイナマイゼーション)ことを含む。これにより、C1と称される第1の100倍希釈物が得られる。第2の100倍希釈物(C2)は、第1の100倍希釈物(C1)1部と担体99部とを混合することによって調製される。この手順を更に10回繰り返して、第12の100倍希釈物C12を調製する。通常、必要な希釈係数に至るまで、各後続の希釈物について別の容器を用いる。関連する希釈係数について同様の手順を行って、例えば、希釈物C30、C50、及びC200を得る。この方法は、ホメオパシー分野において広く許容されている。例えば、記載する目的のために参照によって本明細書に援用される非特許文献1を参照。C12、C30、及びC200は、それぞれ、抗体の一次マトリックス溶液(マザーチンキ)を100<sup>1</sup>2回、100<sup>3</sup>0回、及び100<sup>2</sup>0<sup>0</sup>回希釈したものを表す。

10

#### 【0006】

好ましい活性化増強型は、多くの場合、その分子型の幾つかの100倍希釈物の混合物である。例えば、C12、C30、及びC50希釈物の混合物、又はC12、C30、及びC200希釈物の混合物である。様々なホメオパシー希釈物の混合物を用いる場合、組成物の各成分、例えば、C12、C30、C50、C200は、最後から2番目の希釈物、即ち、それぞれC11、C29、及びC199が得られるまで上記手順に従って別々に調製し、次いで、混合組成に従って1つの容器内に各成分1部を添加し、必要な量、即ち、100倍希釈の場合は97部の担体と混合する。

20

#### 【0007】

ホメオパシー増強の例は、記載する目的のために全文が参照によって本明細書に援用される特許文献6及び7に記載されている。用語「活性化増強型」及び用語「超低用量」は、十分に支持的であり、元来互いに同義であることを意味する。

#### 【0008】

#### 医薬の定性的/定量的評価

物質の生物学的活性を測定する方法は、例えば、特許文献8等、当技術分野において知られている。前記活性は、物質を添加する前後における試験サンプルに対する酵素応答の速度の比によって表される。「サンプル中の最適物質濃度」は、インビトロで測定される。しかし、この方法は、ホメオパシー技術に従って調製した医薬の効力の測定には適していない。

30

#### 【0009】

一定磁場に存在する活性化医薬に対してコヒーレント直線偏光を照射することによってホメオパシー医薬の効力を測定する方法が、当技術分野において知られている。試験媒体の様々な点からの、光パイアスモードにおけるその偏光成分強度の時間関連累積値を用いて、散乱伝搬放射線を測定する。分析を実施して、超低変動の伝搬強度の周波数スペクトルを計算し、データを標準的な試料と比較する。例えば、特許文献9を参照。

#### 【0010】

また、ホメオパシー医薬又は活性化増強型の定性的測定の方法も知られている。前記方法は、試験媒体を標準的な試料で処理し、物理的及び化学的パラメータの変化を記録することを含む。測定されたホメオパシー医薬又は物質の増強型の構造及び/又は組成と構造及び/又は組成が略同様であるか又は同様の公知の物質のセットに加えて、これら公知の物質に対する抗体の構造及び/又は組成を用いる。ホメオパシー医薬又は物質の増強型の同定は、前記公知の物質に基づくものとし、ホメオパシー医薬又は物質の増強型を反応媒体に導入したときの適切な抗体との反応は、抗原-抗体反応に基づく免疫化学的分析方法を用いて記録される変化を伴う(特許文献10)。

40

#### 【0011】

しかし、従来技術の方法は、薬物のアイデンティティ及び活性化増強型に関連する効力の確実且つ再現可能な定性的及び定量的測定を提供するものではない。これは、上記ホメオパシー技術に従って調製される活性化医薬を含む。

50

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0012】

【特許文献1】露国特許第2191601号明細書

【特許文献2】露国特許第2192888号明細書

【特許文献3】露国特許第2332236号明細書（英語バージョン：欧州特許第2123300号明細書）

【特許文献4】露国特許第2438707号明細書（米国特許出願公開第2011/0008452号明細書）

【特許文献5】露国特許第2161955号明細書

10

【特許文献6】米国特許第7,572,441号明細書

【特許文献7】米国特許第7,582,294号明細書

【特許文献8】露国特許第2181890号明細書

【特許文献9】露国特許第2112976号明細書

【特許文献10】露国特許第2195648号明細書

## 【非特許文献】

## 【0013】

【非特許文献1】V. Schwabe "Homeopathic medicines", M., 1967, p. 14 - 29

20

## 【発明の概要】

## 【0014】

第1の物質の活性化増強型の活性を測定する方法であって、前記第1の物質の活性化増強型を提供する工程と、前記活性化増強型中に前記物質の分子型が存在しないことを保証する工程と、前記第1の物質と構造的に類似する第2の（治療的）物質の分子型を提供する工程と、好適な分析方法を用いて、前記第2の物質の分子型の少なくとも1つの物理的パラメータ、化学的パラメータ、又は生物学的パラメータ（A）を測定する工程と、前記第2の物質の分子型を前記第1の物質の活性化増強型で処理する工程と、前記分析方法を用いて、処理された前記第2の物質の分子型の少なくとも1つの物理的パラメータ、化学的パラメータ、又は生物学的パラメータ（A<sub>M</sub>）を測定する工程とを含み、前記物質の活性化増強型の活性が、AとA<sub>M</sub>との差の程度である方法。

30

## 【0015】

前記方法は、式  $X = C | A - A_M | / A$  に従って、前記第1の物質の活性化増強型の活性を相対単位（X）で表すことを更に含む。

## 【0016】

前記方法は、i) 第1の物質の活性化増強型で第3の物質の分子型を処理する工程と、ii) 分析方法を用いて、前記第3の物質の分子型の少なくとも1つの物理的パラメータ、化学的パラメータ、又は生物学的パラメータ（B）を測定する工程と、iii) 前記分析方法を用いて、処理された前記第3の物質の分子型の少なくとも1つの物理的パラメータ、化学的パラメータ、又は生物学的パラメータ（B<sub>M</sub>）を測定して、前記方法の特異性を測定する工程とを更に含み、前記少なくとも1つの物理的パラメータ、化学的パラメータ、又は生物学的パラメータが、A - A<sub>M</sub> については統計的に有意に変化するが、B - B<sub>M</sub> については統計的に有意に変化しない場合に、前記方法が特異的であるとみなす。

40

## 【0017】

分析方法が、高速液体クロマトグラフィーである前記方法。

## 【0018】

分析方法が、酵素免疫アッセイ分析である前記方法。

## 【0019】

分析方法が、核磁気共鳴である前記方法。

## 【0020】

物質の分子型が存在しないことを保証する工程が、前記物質の分子型を除去することを

50

含む前記方法。

【0021】

物質が、抗体である前記方法。

【0022】

抗体が、ポリクローナル抗体である前記方法。

【0023】

物質が、有機小分子である前記方法。

【0024】

活性化増強型が、液体である前記方法。

【0025】

活性化増強型が、固体担体に含浸している前記方法。

【0026】

前記第2の物質が、前記第1の物質の受容体である前記方法。

【0027】

前記第2の物質が、前記第1の物質に対する抗体である前記方法。

【0028】

前記第1の物質が、抗原に対する抗体であり、前記第2の物質が、前記抗原の受容体である前記方法。

【0029】

前記第1の物質が、抗原に対する抗体であり、前記第2の物質が、前記抗原である前記方法。

【0030】

前記第1の物質が、抗原に対する抗体であり、前記第2の物質が、前記抗原である前記方法。

【0031】

前記第2の物質が、前記第1の物質によって触媒される酵素である前記方法。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】図1は、プラセボと比較した、活性化増強担体を添加したときのIFN-ガンマIの化学シフトの変化を示す。

【図2】図2は、プラセボと比較した、活性化増強担体を添加したときのIFN-ガンマIIの化学シフトの変化を示す。

【図3】図3は、プラセボと比較した、活性化増強担体を添加したときのIFN-ガンマIIIの化学シフトの変化を示す。

【図4】図4は、IFN-ガンマ-R1についての323nmにおける経時変化である。

【図5】図5は、IFN-ガンマ-R2についての323nmにおける経時変化である。

【発明を実施するための形態】

【0033】

本発明は、添付の特許請求の範囲と関連して定義される。特許請求の範囲に関して、関連する定義が上にもたらされ、更なる定義が以下にもたらされる。

【0034】

「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、別の分子の特定の空間的な極性の構成に特異的に結合し、それにより、それと相補的であると定義される免疫グロブリンを意味するものとする。特許請求の範囲において列挙されている抗体は、天然、ポリクローナル又はモノクローナルであってよい完全な免疫グロブリン又はその断片を含んでよく、それらとしては、例えば、IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b及びIgG3、IgMなどの種々のクラス及びアイソタイプを挙げることができる。その断片としては、Fab、Fv及びF(ab')<sub>2</sub>、Fab'などを挙げることができる。単数形の「抗体(antibody)」は、複数形の「抗体(antibodies)」を含む。

10

20

30

40

50

## 【0035】

第1の物質及び第2の物質に関して「生物学的に関連している」という用語は、前記第1の物質が抗体である場合、前記第2の物質が前記第1の物質に対する抗原、前記第1の物質の受容体、前記第1の物質の受容体断片等であることを意味する。生物学的に関連している物質は、その用語が本願で用いられるとき、「構造的に類似している」。即ち、「構造的に類似している」の1つの意味は、物質が生物学的に関連していることである。また、「構造的に類似している」とは、元の物質と相互作用する生物起源又は合成起源の物質、又は元の物質と相互作用することができる生物起源又は合成起源の同じ分子と相互作用することができる物質も含む。

## 【0036】

「活性化増強型」又は「増強型」という用語は、抗体などの物質の分子型を含む最初の溶液のホメオパシーポテンタイゼーションの生成物を示すために使用される。抗体のホメオパシーポテンタイゼーションの例は、記載する目的のために全文が参照によって本明細書に援用される、米国特許第7,572,441号及び7,582,294号に記載されている。抗体は、3つの因子が存在すれば、「活性化増強」型又は「増強」型である。第1に、「活性化増強」型抗体は、ホメオパシーの技術分野では広く受け入れられている調製プロセスの生成物である。第2に、「活性化増強」型抗体は、現代薬理学において広く受け入れられている方法によって決定される生物活性を有さなければならない。第3に、「活性化増強」型抗体により示される生物活性は、ホメオパシーのプロセスの最終生成物に分子型抗体が存在することによっては説明することができない。

## 【0037】

ヒト対象のホメオパシー治療に関してはかなりの量の議論がなされてきた。本発明は、「活性化増強」型抗体を得るために、受け入れられているホメオパシーのプロセスに依拠するが、本発明は、活性を証明するためにはヒト対象におけるホメオパシー単独に依拠するのではない。驚いたことに、本出願の発明者は、認められている薬理学的モデルにおいて、出発分子型抗体を連続して多数回希釈することから最終的に得られた溶媒が、標的希釈物中に分子型抗体の痕跡が存在することとは無関係の決定的な活性を有することを発見し、十分に実証した。また、特許請求された「活性化増強」型抗体は、その生物活性が、最初の出発溶液から残っている分子型抗体が存在することによっては説明することができない溶液又は固体調製物のみを包含する。言い換えれば、「活性化増強」型抗体は、最初の分子型抗体の痕跡を含有してよいことが意図されているが、連続して希釈した後に残った分子型抗体は非常に低濃度であるので、当業者は、認められている薬理学的モデルにおいて観察される生物活性が、いかなる程度の妥当性でも残りの分子型抗体に起因すると考えることができない。

## 【0038】

本発明は特定の理論に限定されるものではないが、本発明の「活性化増強」型抗体の生物活性は、最初の分子型物質には起因しない。その中に含まれる分子型抗体の濃度が、認められている分析的な技法、例えば、キャピラリー電気泳動及び高速液体クロマトグラフィーなどの検出限界を下回る、液体又は固体の担体の「活性化増強」型抗体が好ましい。その中に含まれる分子型抗体の濃度がアボガドロ数（即ち、 $6.022 \times 10^{23}$ 個の担体分子当たり分子型1分子）未満である液体又は固体の形態の「活性化増強」型抗体が特に好ましい。

## 【0039】

本発明の医薬組成物により、細菌感染症並びに急性及び慢性ウイルス感染症などの、感染性疾患の治療予防のために利用可能な調製物の集積が拡大する。

## 【0040】

本発明のこの態様に係る組み合わせ医薬組成物は、液体の形態であっても固体の形態であってもよい。本発明に係る組み合わせ薬物の活性化増強成分を調製するための好ましい手順は、それぞれ100倍単位ホメオパシー希釈物C12、C30、及びC50に相当する、抗体の一次マトリックス溶液を $100^{12}$ 倍希釈、 $100^{30}$ 倍希釈及び $100^{50}$

10

20

30

40

50

倍希釈した3種の水-アルコール希釈物の混合物、又は、それぞれ100倍単位ホメオパシー希釈物C12、C30及びC200に相当する、抗体の一次マトリックス溶液を100<sup>12</sup>倍希釈、100<sup>30</sup>倍希釈及び100<sup>200</sup>倍希釈した3種の水-アルコール希釈物の混合物を使用することである。固体剤形を調製するために、固体担体を、ホメオパシーのプロセスによって得られた所望の希釈物で処理する。本発明の組み合わせの固体単位剤形を得るために、担体塊に各希釈物を浸透させる。所望の組み合わせ剤形の調製には、いずれの浸透順序も好適である。

#### 【0041】

医薬組成物に含まれる活性化増強型が抗体から調製される場合、これは、ホメオパシーの技術分野で受け入れられているプロセスによって行われる。出発抗体は、公知のプロセスに従って、例えば、どちらも参照により本明細書に組み込まれる、Immunotechniques、G. Frimel、M.、「Meditsyna」、1987年、9~33頁；「Hum. Antibodies. Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after」、Laffly E.、Sodoyer R.、2005年、14巻、1~2号、33~55頁に記載の通り調製されたモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であってよい。

10

#### 【0042】

モノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ技術によって得ることができる。このプロセスの最初の段階は、ポリクローナル抗血清の調製の過程ですでに開発された原理に基づく免疫化を含む。研究のさらなる段階は、同一の特異性を有する抗体のクローンを生成するハイブリッド細胞の作製を伴う。それらの別々の単離は、ポリクローナル抗血清調製物の場合と同じ方法を使用して実施する。

20

#### 【0043】

ポリクローナル抗体は、動物の能動免疫化によって得ることができる。この目的で、例えば、適切な動物（例えば、ウサギ）に、適切な抗原（サイトカイン及び受容体）の一連の注射を受けさせる。動物の免疫系により、対応する抗体が生成し、それを公知の様式で動物から採取する。この手順により、単一特異性の抗体が豊富な血清を調製することが可能になる。

#### 【0044】

所望であれば、抗体を含有する血清は、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、塩析による分画、又はイオン交換クロマトグラフィーを使用することによって精製することができる。得られた精製抗体濃縮血清を、活性化増強型の抗体を調製するための出発材料として使用することができる。得られた、溶媒、好ましくは水又は水とエチルアルコールの混合物中の抗体の最初の溶液の好ましい濃度は、約0.5mg/mlから約5.0mg/mlまでに亘る。

30

#### 【0045】

CD4受容体に対するポリクローナル抗体からなる分子型を調製するための例示的な手順は、以下の通り説明することができる。血液試料を採取する7~9日前に、所望の抗原を、ウサギに1~3回静脈内注射して、ウサギの血流中のポリクローナル抗体のレベルを上昇させる。免疫化したら、抗体レベルを検査するために血液試料を取得する。一般には、可溶性抗原の免疫応答の最大レベルは、抗原を最初に注射した後40~60日以内に実現される。第1の免疫化サイクルが達成されたら、ウサギを30日のリハビリテーション期間におき、その後、更に1~3回静脈内注射して再免疫化を実施する。所望の抗体を含有する抗血清を得るために、ウサギから、免疫化されたウサギの血液を採取し、50mlの遠心管に入れる。管の側面に形成された生成物である血餅を木べらで除去し、管の中心の血餅にロッドを入れる。次いで、血液を冷蔵庫に約40の温度で一晩置く。次の日に、へらの上の血餅を除去し、残りの液体を1分当たり13,000回転で10分間遠心分離する。上清の流体が標的抗血清である。得られた抗血清は一般には黄色である。抗血清に、20%のNaN<sub>3</sub>（重量濃度）を最終濃度が0.02%になるまで加え、使用前に、-20の温度で凍結した状態で保管する、又は、NaN<sub>3</sub>なしで-70の温度で

40

50

保管する。ガンマイナーフェロンに対する標的抗体を抗血清から分離するためには、以下の固相吸収の連続が適している：

ウサギの抗血清10mlを0.15MのNaClで2倍希釈し、その後、6.26gのNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加え、混合し、4で12~16時間インキュベートする。沈渣を遠心分離によって除去し、リン酸緩衝液10ml中に希釈し、同じ緩衝液に対して外界温度で一晩にわたって透析する。沈渣を除去した後、溶液をリン酸緩衝液によって平衡させたDEAE-セルロースカラムに適用する。溶出液の280nmにおける光学濃度を測定することによって抗体画分を決定する。

単離された粗製の抗体を、アフィニティークロマトグラフィー法を使用し、得られた抗体を、クロマトグラフィー媒体の不溶性マトリックス上にあるCD4抗原に付着させることによって精製し、その後濃縮した水性塩類溶液により溶出させる。

得られた緩衝溶液を、活性化増強型の抗体を調製するために用いるホメオパシー希釈プロセスのための最初の溶液として使用する。

CD4受容体に対する抗原精製ポリクロナルウサギ抗体の最初のマトリックス溶液の好ましい濃度は、0.5~5.0mg/mlであり、2.0~3.0mg/mlであることが好ましい。

#### 【0046】

好ましくは、固体単位剤形の医薬組成物は、活性化増強型抗体CD4受容体の水希釈物又は水-アルコール希釈物を予め染み込ませた薬学的に許容される担体の顆粒剤から調製する。固体剤形は、錠剤、カプセル剤、ロゼンジ、及びその他を含めた製薬技術分野で公知の任意の形態であってよい。不活性な医薬成分として、医薬品の製造において使用されるグルコース、スクロース、マルトース、デンプン、イソマルトース、イソマルト及び他の単糖、オリゴ糖及び多糖、並びに上記の不活性な医薬成分と、潤滑剤、崩壊剤、結合剤及び着色料を含めた他の薬学的に許容される賦形剤、例えば、イソマルト、クロスボイドン、シクラミン酸ナトリウム、サッカリンナトリウム、無水クエン酸など)との技術的混合物を使用することができる。好ましい担体は、ラクトース及びイソマルトである。薬剤剤形は、標準の製薬用賦形剤、例えば、結晶セルロース、ステアリン酸マグネシウム、及びクエン酸を更に含んでよい。

#### 【0047】

経口用の固体形態を調製するために、ラクトースの顆粒100~300µmを、CD4受容体に対する活性化増強型抗体の水溶液又は水-アルコール溶液に、ラクトース5kg又は10kgに対して抗体溶液1kg(1:5~1:10)の比率で浸透させる。浸透に影響を及ぼすために、ラクトース顆粒を、煮沸ベッドプラント(例えば、Huttlin GmbHの「Huttlin Pilotlab」)中の流動煮沸ベッド中で染み込ませるための注水に曝露させ、その後、40未満の加熱した空気の流れによって乾燥する。活性化増強型抗体を染み込ませた乾燥顆粒(10~34重量部)の推定量をミキサーに入れ、25~45重量部の「染み込ませていない」純粋なラクトース(処理効率を低下させることなく技術的なプロセスの費用を縮小し、それを単純化及び加速するために使用する)と、0.1~1重量部のステアリン酸マグネシウム、及び3~10重量部の結晶セルロースと一緒に混合する。得られた錠剤集団を均一に混合し、(例えば、Korsch-XL400打錠機において)直接乾式プレスすることによって錠剤化して、150~500mg、好ましくは、300mgの丸剤を形成する。錠剤化した後、100倍単位ホメオパシー希釈物C12、C30及びC50の混合物の形態、又は100倍単位ホメオパシー希釈物C12、C30及びC200の混合物の形態で、CD4受容体に対する活性化増強型抗体の水-アルコール溶液(丸剤1粒当たり3.0~6.0mg)を染み込ませた丸剤300mgを得る。

#### 【0048】

治療の目的で、本発明の組み合わせを、1日1回から1日4回まで、好ましくは1日2回、それぞれに1つ又は2つの組み合わせ単位剤形を含めて投与することが好ましい。

#### 【0049】

10

20

30

40

50

請求する発明によって求められる技術的結果は、ホメオパシー技術に従って調製される医薬、即ち、任意の実用的に検出可能な濃度の分子型を含有しない医薬を同定する方法の信頼性及び再現性を高めることである。更に、請求する発明は、医薬、即ち、活性化増強型に関連する薬学的調節効力を測定する方法の信頼性及び再現性を高めることを目的とする。これら方法は、インピトロ、即ち、体外で実施される。

**【 0 0 5 0 】**

本発明の技術的結果を達成する方法は、最終的に、活性化プロセス中に得られる活性化増強型に関連する調節効力の程度を測定することを目的とする。ホメオパシー技術によって調製される医薬、即ち、活性化増強型を得るための、分子型を含有する出発物質の加工は、担体で複数回連続希釈して、前記出発物質の濃度を低下させることを含む。

10

**【 0 0 5 1 】**

活性化増強型の効力は、異なる物質の治療用量の物理的、化学的、及び/又は生物学的性質を変化させるか又は前記性質に作用する能力に現れる。治療用量は、活性化増強型の調製において用いられる出発物質の分子の構造に類似している分子を含有する。請求する発明は、構造的に類似する物質の活性化増強型を添加した後に、分析方法を用いて治療用量の物理的パラメータの変化を測定することを含む。かかる分析方法は、治療用量中の活性化増強型の有無を測定することができる。前記分析方法は、活性化増強型と混合する前及び後に治療用量の1以上の物理的パラメータを測定する。活性化増強型と混合する前及び後の治療用量の効力の程度も、分析方法を用いて測定することができる。特徴的なパラメータの変化は、相対単位で提供され得る。

20

**【 0 0 5 2 】**

特徴的なパラメータの測定は、活性化増強型中に検出可能なレベルの分子型が存在することによって影響を受け得る。分子型の分子が検出可能なレベルで活性化増強型中に存在する場合、活性化増強型と治療用量とを混合する前に、これら分子を活性化増強型から除去する必要がある。サンプル中に分子型が存在しないとは、本発明主題において、前記分子型を検出できないことと同義である。活性化増強型から分子型を除去する/検出できなくする1つの手段は、例えば、ホメオパシー100倍希釈等で更に希釈することである。別の手段は、分子篩を用いることである。分子篩は、正確且つ均一なサイズの非常に小さな穴を有する物質である。これら穴は、小さな分子は通過させるが、大きな分子はブロックすることができる程度に十分小さい。分子篩の例としては、活性炭及びシリカゲルが挙げられる。分子篩と同様に、担体は進行させるが、分子型は停止させるか又は更には減速させる傾向を有する任意の手順及び/又は装置を用いて分子型を除去するか又は検出できなくすることもできる。したがって、高圧液体クロマトグラフィー(「HPLC」)装置の固定相が分子型の進行を停止又は減速させるが、活性化増強型を含む移動相は、比較的スムーズに装置中を進むHPLC等のプロセスを用いてもよい。固相に対する分子型の親和性等のパラメータに依存して、分子型は、少なくとも多少の公知の期間、HPLC装置の出力から完全に存在しなくなる。

30

**【 0 0 5 3 】**

更に、出発物質の分子が活性化増強担体中に存在する場合、十分に確立された方法を用いて除去することができる。具体的には、出発物質として用いられるタンパク質の分子は、例えば、活性化増強担体を加熱してタンパク質を変性させ、次いで、濾過することによって除去することができる。或いは、高濃度のアルカリ及びアルカリ土類金属の中性塩によってタンパク質を沈殿させ、次いで、濾過する脱塩方法を用いてもよい。他の可能な方法としては、電気透析、イオン交換樹脂を用いる脱イオン化、逆浸透、及びより大きな孔を通して予備的に濾過するか又は濾過しない限外濾過(分子濾過)が挙げられる。当技術分野において見出されている更なる例については、B. M. Steward, The production of high-purity water in the clinical laboratory, Laboratory Medicine, vol. 31(11), pp. 605-611(2000); J. Grimm, D. Bessarabov, R. Sanderson, Review of electro-a

40

50

ssisted 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 Purification, An Industry Service Publication (<http://bioresearchonline.com>.) を参照。これら刊行物は、それぞれ、記載する目的のために参照によって本明細書に援用される。 10

【0054】

請求する方法は、様々な定性的及び定量的測定方法を用いて実現することができるので、活性化増強型の存在及び効力の試験において高い感度及び再現性が確保される。定性的及び定量的方法としては、クロマトグラフィー質量分析等の質量分析、ガス液体クロマトグラフィー（「GLC」）及び高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）、NMR分光法、免疫酵素アッセイ（「IEA」）が挙げられる。

【0055】

クロマトグラフィーは、2つの不混和性相間の均一分布の差によって引き起こされる混合物の成分の分配に基づく。クロマトグラフィーにおける1つの相は、移動しない（吸着剤）が、別の相は、移動する（溶離剤）。高圧（400 bar以下）及び溶媒スラリー（一般的に3  $\mu\text{m}$  ~ 5  $\mu\text{m}$ 、現在では1.8  $\mu\text{m}$ 以下）が、HPLCの顕著な特徴である。HPLC分析を用いる定性的測定は、クロマトグラフィーピークの保持時間の評価に基づく。定量的測定は、ピーク面積の評価に基づく。 20

【0056】

核磁気共鳴分光法（「NMR分光法」）は、特定の原子核の磁性を利用する研究技術である。NMRは、含有されている原子又は分子の物理的及び化学的性質を測定する。NMRは、核磁気共鳴の現象に依拠し、分子の構造、運動、反応状態、及び化学的環境についての詳細な情報を提供することができる。分子中の原子の周りの分子内磁場は、共鳴周波数を変化させて、分子の電子構造の詳細が得られるようにする。ソフトウェアによってピークのシグナル強度を分析することができ、前記ピークは、最適緩和条件下において、その種のプロトンの数と相関する。シグナル強度の分析は、曲線化面積を計算する数学的方法である積分によって行われ、そのサイズは、面積に依存する。 30

【0057】

免疫酵素アッセイ（「IEA」）は、抗体又は免疫グロブリンの使用によって溶液中における巨大分子の存在又は濃度を測定する生物化学的試験である。免疫アッセイによって検出される巨大分子は、「アナライト」と呼ばれることが多い。理想的には、抗体は、アナライトに、また、アナライトのみに結合する。一旦アナライトに結合すると、抗体は、アナライトの単一分子の存在を示すシグナルを発する。このようなシグナルは、結合した際の光の光子の即時自然放出である場合もあり、又は何らかの「ポーリング」シグナルが発生した際のアナライトに結合している抗体による光の光子の放出である場合もある。同様に、アナライトに結合している抗体は、例えば、未結合抗体の除去及び残りの結合抗体の数の評価を可能にするIEAの後続工程まで、未結合抗体とは異なる反応をし得る。更に、抗体は、電流が印加されたときに弾性変形する圧電性結晶に結合することもできる。交流電流（A.C.）は、結晶において特徴的な周波数の定在波を発生させる。周波数は、結晶の弾性的性質に大きく依存し、この性質は、結晶に付着しているものによって影響を受ける。標的アナライトの抗体に対する結合により共鳴周波数が変化して、結合シグナルを与える。請求する方法を実現するために生物学的方法及び他の方法を適用可能である。例えば、Zolotov, Yu. A. (編), Basics of analytical chemistry (上下巻), Textbook for universit 40 50

ies, 第3版(2004); Vasilyev, V. P., Analytical chemistry, (1989); Otto, M., Up-to-date methods of analytical chemistry, (2003)を参照。

【0058】

活性化増強担体の出発物質の分子を検出するための分析方法と、活性化増強担体と相互作用する前及び後に治療的物質の少なくとも1つの特徴的なパラメータを分析方法によって測定することとを併用して、発明者らは、以下のことを実証(立証)する。第1に、担体に関連する調節活性は、出発物質の分子の存在によって説明されるものではなく、また、前記担体の物理的、化学的、及び/又は生物学的性質は、治療的物質の物理的、化学的、及び/又は生物学的性質とは異なる。第2に、活性化増強担体は、出発物質を用いることによって得られ、この場合、活性化増強型は、出発物質の技術的処理中に使用され、前記担体を使用して前記出発物質の濃度を複数回段階的に低下させることによって代表される手順によって確保される。最後に、インビトロにおける証拠に基づいて、活性化増強担体を用いて調製した製剤についての信憑性及びアイデンティティを立証する。即ち、測定が容易な濃度の分子型から始めて、担体を用いて分子型の濃度を複数回段階的に低下させることによって活性化増強型が作製される。更に、活性化増強型と相互作用する前及び再度かかる相互作用後に治療型の少なくとも1つの特徴的なパラメータを請求の通り分析測定することは、活性化増強型に関連する調節効力の程度を相対無次元活性単位(放出活性)で定量するのに役立つ。

10

【0059】

活性化増強型に関する調節効力の程度は、相対活性単位(放出活性)で表される特徴的なパラメータの定量的変化に基づいて測定される、式(1)：

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

Xは、活性単位(AU)数であり；

Cは、治療的物質の初期の物理的、化学的、及び/又は生物学的性質を反映する特徴的なパラメータを測定するために用いられる分析方法、並びに特徴的なパラメータ値に付随する比例性無次元定数である。具体的には、例えば、 $C = 10^k$  (式中、kは、1、2、3等の数列の整数である)であり；

Aは、活性化増強型(技術的に処理された担体)と相互作用する前の治療的物質の特徴的なパラメータの値であり；

30

$A_M$ は、活性化増強型(技術的に処理された担体)と相互作用した後の治療的物質の同じ特徴的なパラメータの値である。

【0060】

請求する方法は、様々な定性的及び定量的測定方法を用いて実現することができるので、分光法、特に質量分析、クロマトグラフィー質量分析(ガス液体クロマトグラフィー(「GLC」))、及び2つの不混和性相間の均一分布の差によって引き起こされる混合物の成分の分離に基づく高速液体クロマトグラフィー(「HPLC」)等の超低濃度物質の試験において高い感度及び再現性が確保される。クロマトグラフィーにおける1つの相は、移動しない(吸着剤)が、別の相は、移動する(溶離剤)。高圧(400bar以下)及び溶媒スラリー(一般的に $3\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$ 、現在では $1.8\mu\text{m}$ 以下)が、HPLCの顕著な特徴である。HPLC分析を用いる定性的測定は、クロマトグラフィーピークの保持時間の評価に基づく。定量的測定は、ピーク面積の評価に基づく。

40

【0061】

請求する方法の実現において用いられる別の技術は、特定の原子核の磁性を利用する核磁気共鳴分光法(「NMR分光法」)である。NMRは、含有されている原子又は分子の物理的及び化学的性質を測定する。それは、核磁気モーメントの再配向によって誘導される周波数(所謂、NMR周波数)における外部磁場に置かれたときのゼロスピン核を有する物質による電磁エネルギーの共鳴吸収及び放出に依拠し、この場合、所謂化学シフトが特徴的なパラメータである。更に、上述の技術は、免疫酵素アッセイ(IEA)、その表面上における免疫複合体の形成及び破壊に起因する受容体で被覆された層の重量の増加

50

又は減少によって生じる圧電共振子 ( $f$ ) の共鳴周波数の差によってその分析シグナルが表される圧電性イムノセンサの使用を含む。請求する方法を実現するために生物学的方法及び他の方法を適用可能である (例えば、Zolotov, Yu. A. (編), *Basics of analytical chemistry* (上下巻), *Textbook for universities*, 改訂増補第3版: Vysshaya shkola Publisher (2004); Vasilyev, V. P., *Analytical chemistry*, (1989); Otto, M., *Up-to-date methods of analytical chemistry*, (2003) を参照)。

#### 【0062】

更に、活性化増強担体中に出発物質の分子が存在する場合、十分に確立された方法を用いて除去することができる。具体的には、出発物質として用いられるタンパク質の分子は、例えば、活性化増強担体を加熱してタンパク質を変性させ、次いで、濾過することによって除去することができる。或いは、高濃度のアルカリ及びアルカリ土類金属の中性塩によってタンパク質を沈殿させ、次いで、濾過する脱塩方法を用いてもよい。他の可能な方法としては、電気透析、イオン交換樹脂を用いる脱イオン化、逆浸透、及びより大きな孔を通して予備的に濾過するか又は濾過しない限外濾過 (分子濾過) が挙げられる。当技術分野において見出されている更なる例については、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. <http://bioresarchonline.com> を参照) を参照。これら刊行物は、それぞれ、記載する目的のために参照によって本明細書に援用される。

#### 【0063】

活性化増強担体中に出発物質の分子を検出するための分析方法と、活性化増強担体と相互作用する前及び後に治療的物質の少なくとも1つの特徴的なパラメータを分析方法によって測定することを併用して、発明者らは、以下のことを実証 (立証) する。第1に、担体に関連する調節活性は、出発物質の分子の存在によって説明されるものではなく、また、前記担体の物理的、化学的、及び/又は生物学的性質は、治療的物質の物理的、化学的、及び/又は生物学的性質とは異なる。第2に、活性化増強担体は、出発物質を用いることによって得られ、この場合、活性化増強型は、出発物質の技術的処理中に使用される手順、即ち、前記担体を使用して前記出発物質の濃度を複数回段階的に低下させることによって確保される。最後に、インピットロにおける証拠に基づいて、活性化増強担体を用いて調製した製剤について信憑性及びアイデンティティを立証する。

#### 【0064】

更に、活性化増強担体と相互作用する前及び後に治療的物質の少なくとも1つの特徴的なパラメータを請求の通り分析測定することは、担体に関連する調節効力の程度を相対無次元活性単位 (放出活性) で定量するのに役立つ。

#### 【0065】

担体に関連する調節効力の程度を測定するために、以下の連続手順を実施する：

10

20

30

40

50

a . 担体を用いて濃度を段階的に低下させる複数の段階によって、出発物質の技術的  
加工（処理）の過程で増強される調節活性を有する担体を調製する工程であって、後者が  
、前記出発物質の分子型を含有しない工程；

b . 工程 a で得られる溶液中に存在する物質の特異性を試験する工程であって、

i . 工程 a . ) に記載した担体で前記治療的物質の分子型を処理することと、

i i . 好ましくは、工程 a . ) に記載した担体で異なる物質及び / 又は溶媒の分子  
型を処理することと、

i i i . 前記治療的物質の分子型の少なくとも 1 つの物理的、化学的及び / 又は生  
物学的に特徴的なパラメータ ( A )、及び段落 b . ) i . ) 下における前記組み合わせ (   
A<sub>M</sub> ) を分析的に測定する工程であって、段落 b . ) i . ) の実現による前記特徴的なパ  
ラメータの変化が、統計的に有意である ( 且つ、段落 b . ) i i . ) の実現による変化が  
統計的に有意ではない ) 場合、前記担体は、効果を特異的に調節する - 前記治療的物質の  
物理的、化学的及び / 又は生物学的性質を調節する能力が、その物質に特異的であるとみ  
なすこととを含む工程；

10

c . 等式 ( 1 ) を用いて担体に関連する調節効力を相対活性単位で測定する工程：

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

X、C、A、及び A<sub>M</sub> は、既に定義した通りであり、C は、好ましくは、100 又は 1  
、000 に等しい。

【実施例】

【0066】

20

本発明を以下の実施例によって説明するが、前記実施例は、如何なる形であれ本発明の  
範囲を限定するものではない。

【0067】

実施例 1

実施例 1 の目的は、ヒト IFN - ガンマに対するウサギ Ab の活性化増強型の調節効力  
の程度を測定することにある。ヒトインターフェロン - ガンマ ( 「IFN - ガンマ」 ) に  
対するウサギ抗体 ( 「Ab」 ) の母液から始めて、複数回中間で振盪しながら複数回連続  
希釈して出発物質の濃度を低下させることによって、ヒト IFN - ガンマに対するウサギ  
Ab の活性化増強型を調製した。希釈剤、即ち、担体は、水 - アルコール溶液であった。  
分子型を、100<sup>12</sup>部、100<sup>30</sup>部、及び100<sup>50</sup>部の担体で希釈した。即ち、1  
00倍ホメオパシー希釈物 C12、C30、C50を形成した。出発物質、即ち、ヒト I  
FN - ガンマに対するウサギ Ab の物理的、化学的、及び / 又は生物学的性質の変化を測  
定するために、分光法及び核磁気共鳴分光法 ( NMR 分光法 ) を用いた。

30

【0068】

上述の通り、異なる分子環境では、同じ原子核が異なる NMR シグナルを示す。かかる  
シグナルと標準物質のシグナルとの差により、試験する物質の化学組成によって引き起  
こされる所謂化学シフトを検出することが可能になる。前記化学シフトを、物質の分子式に  
関する情報を反映する特徴的なパラメータとして用いた。

【0069】

IFN - ガンマにおける立体構造の変化を決定するために、活性化増強担体 ( 時に「A  
C」と略す ) によって影響を受けるヒト IFN - ガンマに対するウサギ Ab と類似の構造  
を有する分子を含有する物質を IFN - ガンマに添加し、NMR 分光法を適用した。純水  
の放出活性希釈物をプラセボとして用いた。

40

【0070】

試験サンプルを調製するために、ヒト IFN - ガンマに対する Ab 又はプラセボの活性  
化増強型を 2 : 1 の比で IFN - ガンマに対する Ab の溶液と混合した。そのときの各サ  
ンプル中の IFN - ガンマに対する Ab の最終濃度は、0.8 mg / mL であった。

【0071】

5 mm の三重共鳴及び z 軸グラジエントクライオプローブを備える Bruker Av  
ance 900 MHz 分光計において 25 で NMR 実験を実施した。20 mM Na

50

C1及び10% D<sub>2</sub>Oを含有する20mMリン酸カリウムバッファ(pH6.0)180μLに溶媒和している50μM <sup>15</sup>N標識IFN-ガンマにAC又はプラセボを添加した。1秒間のD1遅延時間でプロトン次元2, 048スキャン及び窒素次元34スキャンの標準的なHSQCパルスシーケンスを用いてスペクトルを取得した。TopsSpinバージョン3.0ソフトウェアを用いてデータを取得した。スペクトルを加工し、NMRView及びSparkyソフトウェアを用いて解析した。観察されたバックボーン共鳴を、IFN-ガンマについて同様の条件下で取得された既に公開されているNMRデータを用いて割り当てた。

【0072】

AC又はプラセボを添加したときのIFN-ガンマにおける化学シフトの変化を図1に示す。図中、

- 上段のリン酸バッファ(pH6.0)中のIFN-ガンマスペクトルの<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H-HSQCシグナルは、IFN-ガンマに対するAbのACが存在しない場合、球状であるが、IFN-ガンマに対するAbのACが存在する場合、楕円形である。フルサイズスペクトル(6.5百万分率~9.5百万分率)をIとして示し、強く摂動しているシグナルを含む領域を拡大し、II及びIIIとして示す。

- 下段のリン酸バッファ(pH6.0)中のIFN-ガンマスペクトルの<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H-HSQCシグナルは、プラセボが存在しない場合、球状であるが、プラセボが存在する場合、楕円形である。フルサイズスペクトル(6.5百万分率~9.5百万分率)をIとして示し、強く摂動しているシグナルを含む領域を拡大し、II及びIIIとして示す。

【0073】

IFN-ガンマに対するAbの活性化増強型をIFN-ガンマに添加するだけで、一般スペクトルにおける化学シフトの顕著な変化が誘導された。IFN-ガンマ50μmにIFN-ガンマに対するAbのACを添加したことに基づいて、9、39、40、D42、Q47、150、F82、F83、S85、119及び120残基について化学シフトの変化が観察された。更に、145及びV117残基に対応するシグナル及び多くの未検出ピークは、消滅したか又は位置が完全に变化した。更に、H次元における約7ppm~約8.5ppmの範囲の異質シグナルは、新たなIFN-ガンマの立体構造の形成を証明する。また、IFN-ガンマに対するAbの活性化増強型をIFN-ガンマに添加すると、HSQCスペクトルの拡大が誘導されたので、これは、IFN-ガンマに対するAbのRA希釈物の存在下で分子の一般変化が变化したことを示す。IFN-ガンマ受容体に対するAbのACの添加及びプラセボの添加は、IFN-ガンマの立体構造に影響を与えなかった(これらデータは、図に反映されていない)。

【0074】

【表1】

サンプル	対応する試験サンプルを添加する前の関連するIFN-ガンマピーク数	対応する試験サンプルを添加しても一般スペクトルにおける位置が変化しなかった、関連するIFN-ガンマピーク数	C=100における物質の調節効力(AU)
IFN-ガンマ+ IFN-ガンマに対するAbのAC	128	117	8,6
IFN-ガンマ+ IFN-ガンマ受容体に対するAbのAC	128	128	-
IFN-ガンマ+水のAC	128	128	-

【0075】

試験結果は、IFN-ガンマに対するAbの活性化増強型を添加するだけで、IFN-ガンマの立体構造に影響が及ぼされることを示した。C=100として式(1)を解くと、A=128; A<sub>M</sub>=113である場合、

10

20

30

40

50

$$= 100 | 128 - 113 | / 128$$

となるので、 $X = 8.6 \text{ UA}$ であった。

#### 【0076】

実施例1の結果は、以下の結論を支持する：

1. C12、C30、C50ホメオパシー希釈物を調製するために用いる技術によって、これら3つのホメオパシー希釈物の混合物を含む活性化増強型は、先験的に、出発物質の分子を含有しない；

2. IFN-ガンマに対するAbの活性化増強型によって処理されたIFN-ガンマに対するAbの分子に構造が類似しているIFN-ガンマの物理的及び化学的性質の変化は、前記活性化増強型が出発物質(IFN-ガンマ)に基づいて調製されたことの確実な証拠を提示する；

3. AB IFN-ガンマの活性化増強型によって処理されたIFN-ガンマの物理的及び化学的性質の変化は、活性化増強型に関連する調節効力の程度をはっきりと確認し、NMR分光法を用いることによって明らかになった活性化増強担体に関連する調節効力を $X = 8.6 \text{ UA}$ として無次元活性単位で表す機会を提供する。

#### 【0077】

##### 実施例2

実施例2は、システインの誘導体化を含む。IFN-ガンマに対するAbの活性化増強型の存在下におけるIFN-ガンマ-R1、IFN-ガンマ-R2の立体構造の変化を、生物物理学的プローブを用いて評価した。生物物理学的プローブを導入する簡便且つ特異性の高い方法は、システインの突然変異誘発に続いて、その環境をプロービングする目的で、調べられる官能基を有する誘導体化試薬と反応させることである。システインの遊離スルフヒドリル基は、様々な試薬と化学的に誘導体化することができ、これは、次いで様々な分光法によって特性評価することができる。ここでは、吸光度測定アプローチによるシステインの近接性を使用した。したがって、IFN-ガンマ、IFN-ガンマ-R1、及びIFN-ガンマ-R2におけるシステインとシステイン誘導体化剤との反応比を立体構造の指標として定量した。

#### 【0078】

野生型IFN-ガンマ-R1及びIFN-ガンマ-R2の立体構造の試験は、溶離液から得られた最高濃度で得られたIFN-ガンマ-R1、IFN-ガンマ-R2の最終濃度を有するstreptカラムから溶離されたIFN-ガンマ-R1、IFN-ガンマ-R2溶液500 $\mu\text{L}$ を調製する工程である工程1で始まる。溶液は、バッファ(2mMリン酸ナトリウム及び0.05%DM(pH6))中で調製した。対照試験は、バッファ溶液(2mMリン酸ナトリウム及び0.05%DM(pH6))500 $\mu\text{L}$ の調製を含む。工程2は、吸光度スペクトルを得ることを含む。工程3は、10mM原液から4-PDSを全てのキュベットに添加して、最終濃度を25 $\mu\text{M}$ にし、それを十分混合することである。工程4は、323nmにおける吸光度ピークが飽和するまで、10分間毎に吸光度スペクトルを記録することである。4-PDSの存在下及び非存在下におけるタンパク質のみの吸光度スペクトルの差をとって323nmにおける吸光度変化を得ることによって、差スペクトルを得た。IFN-ガンマ-R1又はIFN-ガンマ-R2 1分子当たりの4-PDSと反応するシステインの数は、溶液中に存在するIFN-ガンマ-R1又はIFN-ガンマ-R2の量が不確定であるので、推定されなかった。

#### 【0079】

次に、受容体の立体構造に対するIFN-ガンマの影響を試験してもよい。工程1は、400 $\mu\text{L}$ (PBS+0.05%DM+70 $\mu\text{M}$ ノナペプチド+25 $\mu\text{M}$ 4-PDS)+50 $\mu\text{L}$ IFN-ガンマ-R1又はIFN-ガンマ-R2+50 $\mu\text{L}$ IFN-ガンマ(最終濃度:0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )の調製で始まるサンプル試験、及び450 $\mu\text{L}$ (PBS+0.05%DM+70 $\mu\text{M}$ ノナペプチド+25 $\mu\text{M}$ 4-PDS)+50 $\mu\text{L}$ IFN-ガンマ-R1又はIFN-ガンマ-R2及び450 $\mu\text{L}$ (PBS+0.05%DM+70 $\mu\text{M}$ ノナペプチド+25 $\mu\text{M}$ 4-PDS)+50 $\mu\text{L}$ IFN-ガンマ(最終濃度

: 0.04  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) を調製する対照試験を含む。工程 2 で吸光度スペクトルを得る。工程 3 では、10 mM 原液から 4-PDS を全てのキュベットに添加して、最終濃度を 25  $\mu\text{M}$  にし、それを十分混合する。工程 4 では、323 nm における吸光度ピークが飽和するまで、10 分間毎に吸光度スペクトルを記録する。

【0080】

4-PDS の存在下及び非存在下におけるタンパク質のみの吸光度スペクトルの差をとって 323 nm における吸光度変化を得ることによって、差スペクトルを得た。IFN-ガンマ-R1 又は IFN-ガンマ-R2 1 分子当たりの 4-PDS と反応するシステインの数は、溶液中に存在する IFN-ガンマ-R1 又は IFN-ガンマ-R2 の量が不確定であるので、推定されなかった。

10

【0081】

IFN-ガンマに対する Ab の活性化増強型の受容体の立体構造に対する効果の試験は、400  $\mu\text{L}$  (PBS + 0.05% DM + 70  $\mu\text{M}$  ノナペプチド + 25  $\mu\text{M}$  4-PDS) + 50  $\mu\text{L}$  IFN-ガンマ-R1 + 50  $\mu\text{L}$  IFN-ガンマに対する Ab の活性化増強型を調製することによって IFN-ガンマ-R1 又は IFN-ガンマ-R2 を確認する工程 1 で始まる。対照については、450  $\mu\text{L}$  (PBS + 0.05% DM + 70  $\mu\text{M}$  ノナペプチド + 25  $\mu\text{M}$  4-PDS) + 50  $\mu\text{L}$  IFN-ガンマに対する Ab の活性化増強型及び 450  $\mu\text{L}$  (PBS + 0.05% DM + 70  $\mu\text{M}$  ノナペプチド + 25  $\mu\text{M}$  4-PDS) + 50  $\mu\text{L}$  IFN-ガンマ-R1 を調製する。工程 2 では、エッペンドルフチューブ内で成分を予め混合した後、キュベットに移す。工程 3 は、吸光度スペクトルを得ることである。工程 3 では、10 mM 原液から 4-PDS を全てのキュベットに添加して、最終濃度を 25  $\mu\text{M}$  にし、十分混合する。工程 5 は、323 nm における吸光度ピークが飽和するまで、10 分間毎に吸光度スペクトルを記録することを含む。

20

【0082】

4-PDS の存在下及び非存在下におけるタンパク質のみの吸光度スペクトルの差をとって 323 nm における吸光度変化を得ることによって、差スペクトルを得た。IFN-ガンマ-R1 又は IFN-ガンマ-R2 1 分子当たりの 4-PDS と反応するシステインの数。

【0083】

結果を図 4 及び 5 に示す。IFN-ガンマ-R1 (図 4)、IFN-ガンマ-R2 (図 5) についての 323 nm における経時変化。323 nm における吸光度ピークが飽和するまで、10 分間毎に吸光度スペクトルを記録する。4-PDS の存在下及び非存在下において IFN-ガンマ-Cys、IFN-ガンマ-R1、IFN-ガンマ-R2、又は IFN-ガンマ、IFN-ガンマ-R1-Cys、IFN-ガンマ-R2、又は IFN-ガンマ、IFN-ガンマ-R1、IFN-ガンマ-R2-Cys のみの吸光度スペクトルの差をとって 323 nm における吸光度変化を得ることによって、差スペクトルを得る。Ab1 は、IFN-ガンマに対する Ab の活性化増強型である。

30

【0084】

したがって、精製し、洗剤ミセルに可溶化させた IFN-ガンマ-R1 及び IFN-ガンマ-R2 の細胞質ドメインにおいてシステインに結合している立体構造レポーターの構造変化によって証明される通り、IFN-ガンマに対する Ab の活性化増強型によって受容体複合体の立体構造が変化することが示された。受容体の立体構造の変化は、IFN-ガンマが存在しなくてもみられ、これは、IFN-ガンマに対する Ab の活性化増強型がその受容体に直接作用することを示す。

40

【0085】

実施例 3

実施例 3 は、COX-1 酵素アッセイを含む。実施例 3 は、ジクロフェナクが COX-1 の特異的活性を阻害する機会に対する、ジクロフェナクの活性化増強型をシクロオキシゲナーゼ 1 型 (COX-1) 酵素と共にプレインキュベートすることの効果について試験する。蒸留水の活性化増強型をプラセボとして用いた。

50

## 【 0 0 8 6 】

単一濃度の2つの試験サンプル（ジクロフェナク又はプラセボの活性化増強型）を、それぞれ室温（RT）で1時間酵素混合物と共にプレインキュベートした。その後、プレインキュベートした酵素に $10^{-7}$  M（ $IC_{50}$ ）の濃度のジクロフェナクを添加し、室温で5分間第2のプレインキュベートを実施した。次いで、アラキドン酸を添加して反応を開始させ、室温で5分間後に $OD_{590}$ を読み取り、590nmでPerkin Elmer Victor 2プレートリーダーにおいて光学密度（OD）を測定した（表1を参照されたい）。

## 【 0 0 8 7 】

## 【表2】

10

表1. 実験のスケジュール

ウェル複製物数= 3	ウェル複製物数= 3
試験サンプル	対照#1
段階1. 130 $\mu$ Lの酵素「マスターミックス」 (ハップア、ヘム、酵素-COX-1) + 20 $\mu$ Lの試験サンプル	段階1. 130 $\mu$ Lの酵素「マスターミックス」 (ハップア、ヘム、酵素-COX-1) + 20 $\mu$ Lの対照
段階2. RTで1時間インキュベート	
段階3. 20 $\mu$ Lのジクロフェナク ( $10^{-7}$ M, $IC_{50}$ )をウェルに添加	
段階4. RTで5分間インキュベート	
段階5. 20 $\mu$ Lの発色基質TMPD (N,N,N',N'-テトラメチル-p-フェニレンジアミン)を添加し、氷上で維持	
段階6. 10 $\mu$ Lのアラキドン酸を添加することによって反応を開始させ、氷上で維持(最終濃度50 $\mu$ M)	
段階7. RTで3分間インキュベートし、590nmで読み取る(Perkin Elmer Victor IIプレートリーダー)	

20

## 【 0 0 8 8 】

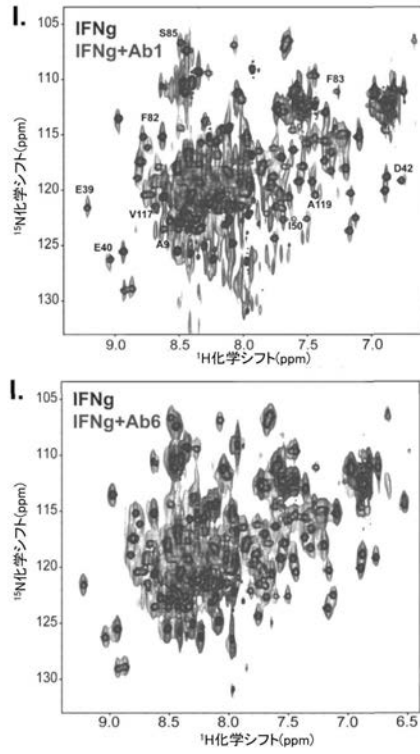
ジクロフェナクを添加する前に酵素源（COX-1）をジクロフェナクの活性化増強型と共に1時間プレインキュベートし、次いで、5分間インキュベートすると、プラセボに比べてジクロフェナクの阻害活性が増大する（78%対34%）ことが示された。

30

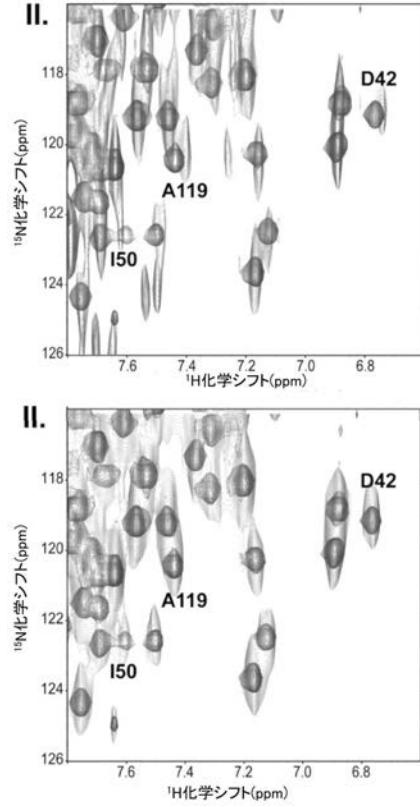
## 【 0 0 8 9 】

本明細書に含まれる説明、実施例、及び図面は、本発明の現在好ましい実施形態を表し、したがって、本発明によって広く検討される発明主題の代表的なものである。本発明の範囲は、当業者に明らかになり得る他の実施形態を完全に包含し、したがって、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲以外の何者にも限定されない。

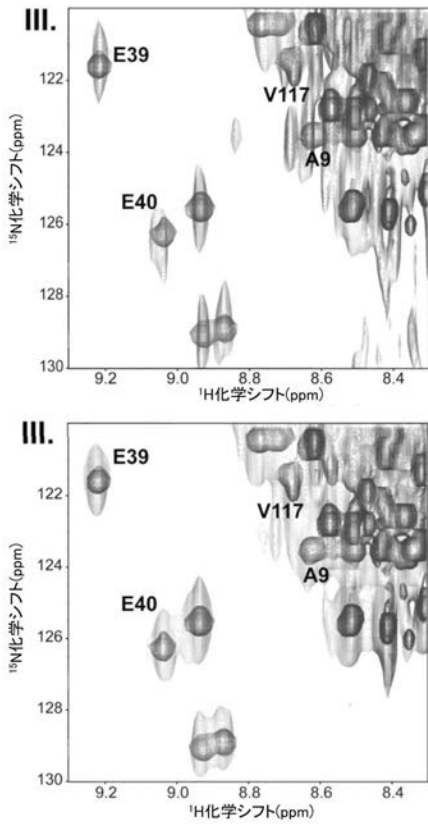
【 図 1 】



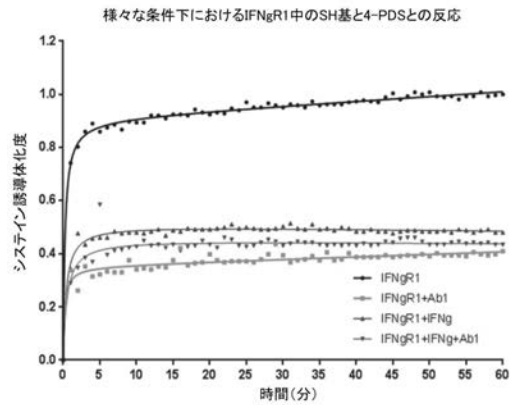
【 図 2 】



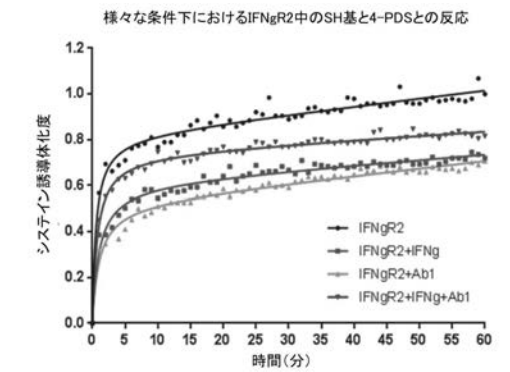
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2014/001183

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. G01N33/68 G01N33/15 G01N24/08 G01N30/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RU 2 195 648 C2 (EHPSHTEJN OLEG IL ICH) 27 December 2002 (2002-12-27) cited in the application	1-12
A	abstract	13-18
X	----- PAVLOV ET AL: "Morphine and antibodies to mu-opiate receptors in ultralow doses: effect on oxygen consumption.", BULLETIN OF EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE, vol. 135 Suppl 7, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 137-9, XP055142829, ISSN: 0007-4888 abstract Materials and Methods; table 1 ----- -/--	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 26 September 2014		Date of mailing of the international search report 13/10/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer van der Kooij, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2014/001183
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EPSTEIN ET AL: "In vitro effects of bipathic treatment with antibodies in ultralow doses during long-term post-tetanic potentiation.", BULLETIN OF EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE, vol. 135 Suppl 7, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 111-3, XP055142832, ISSN: 0007-4888	1-12
A	abstract Material and Methods; table 1	13-18
X	----- T.A. VORONINA, M.V. BELOPOLSKAYA, I.A. KHEYFETS, J.L. DUGINA, S.A. SERGEEVA, O.I. EPSTEIN: "Study of Bipathic Effect of Haloperidol", BULLETIN OF EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE, vol. 145, no. 5, 1 May 2008 (2008-05-01), XP002730253,	1-12
A	abstract page 620, column 2, paragraph 3 - page 621, column 1, paragraph 1; figure 1; table 1 -----	13-18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2014/001183

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
RU 2195648	C2	27-12-2002	NONE
-----			

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 オレグ イリイチ・エプシテイン

ロシア共和国 1 2 7 4 7 3 モスクワ ケーブイ . 7 2 ディー . 3 サモチョクニー パー  
4

专利名称(译)	测量药物调节功效程度的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016512893A</a>	公开(公告)日	2016-05-09
申请号	JP2016503731	申请日	2014-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	OLEG EPSHTEIN伊里奇		
申请(专利权)人(译)	奥列格·伊里奇Epushitein		
[标]发明人	オレグイリイチエプシテイン		
发明人	オレグ イリイチ・エプシテイン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N30/88 G01R33/32		
CPC分类号	G01N24/08 G01N33/6854 G01N2030/8813 G01N33/15 G01N33/68 G01N33/48		
FI分类号	G01N33/53.D G01N30/88.J G01N24/02.530.K		
代理人(译)	广田幸一 山下武		
优先权	2013111962 2013-03-18 RU		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

<p>摘要(译)</p> <p>本发明包括一种测量药物调节效力的方法。该药物是包含治疗成分和顺势疗法成分，即激活增强成分的药物，其中激活增强成分是用于治疗成分和/或其药物作用的任何物理，化学或生物试剂。它具有生物学作用。治疗成分与顺势疗法成分的原料生物学相关。在与增强的激活形式相互作用之前，对治疗形式的至少一个特征参数进行分析测量。在治疗激活类型和增强激活类型之间的相互作用之后，进行相同的分析测量。该数据用于确认任何调节效力的存在是由于增强活化形式中分子形式的存在引起的。此外，如所要求保护的，在与增强的激活形式相互作用之前和在再次相互作用之后测定治疗形式的至少一个特征参数，提供了与增强的激活形式相关的调节功效程度的相对量度。对于以无量纲活动单位（释放活动）进行定量很有用。[选型图]图1</p>	<p>(21) 出願番号 特願2016-503731 (P2016-503731)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成26年3月18日 (2014.3.18)</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成27年11月6日 (2015.11.6)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/182014/001183</p> <p>(87) 国際公開番号 W02014/155206</p> <p>(87) 国際公開日 平成26年10月2日 (2014.10.2)</p> <p>(31) 優先権主張番号 2013111962</p> <p>(32) 優先日 平成25年3月18日 (2013.3.18)</p> <p>(33) 優先権主張国 ロシア (RU)</p>	<p>(71) 出願人 513008959 オレグ イリイチ・エプシテイン ロシア共和国 127473 モスクワ ケーブイ. 72 ディー. 3 サモチヨク ニー パー 4</p> <p>(74) 代理人 100107515 弁理士 廣田 浩一</p> <p>(74) 代理人 100107733 弁理士 渡 良広</p> <p>(74) 代理人 100115347 弁理士 松田 奈緒子</p> <p>(74) 代理人 100163038 弁理士 山下 武志</p>
	最終頁に続く	