

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

34 708

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-38062**
(22) Přihlášeno: **12.06.2020**
(47) Zapsáno: **22.12.2020**

(73) Majitel:
AUMED, a.s., Praha 4, Modřany, CZ

(72) Původce:
RNDr. Juraj Vronka, Praha 6, Řepy, CZ

(74) Zástupce:
VYNÁLEZ s.r.o., Vinohradská 403/17, 120 00
Praha 2, Vinohrady

(54) Název užitého vzoru:
**Kit pro test biologické účinnosti transfer
faktoru**

Kit pro test biologické účinnosti transfer faktoruOblast techniky

5

Technické řešení se týká kitu pro test biologické účinnosti transfer faktoru.

Dosavadní stav techniky

10

Od padesátých a šedesátých let dvacátého století je známý přenosový faktor (transfer faktor), schopný přenést imunologickou reaktivitu dárce na příjemce. Jedná se o směs biologicky aktivních nízkomolekulárních látek, získaných dialýzací homogenátu bílých krvinek (leukocytů).

15

Transfer faktor lze získat různými metodami, nejčastěji je popisována dialýza nebo ultrafiltrace směsi leukocytů periferní krve (lidské nebo zvířecí).

Stav techniky popisují např. dokumenty EP2037949 [Sevapharma A.S., CZ] a dokumenty téže patentové rodiny, např. WO2007143957 a CZ2006377.

20

Dosavadní stav techniky popisuje tyto výrobní technologické kroky:

a) Příprava leukocytárního koncentrátu

25

b) Dialýza a/nebo ultrafiltrace

c) Koncentrace lyofilizací

d) Příprava roztoku surového léčiva

30

e) Mezioperační zkoušky

f) Homogenizace

35

g) Předfiltrace

h) Ultrafiltrace

i) Sterilizující filtrace

40

j) Tepelná inaktivace

k) Rozpínání

45

l) Lyofilizace

Dosud vyráběné transfer faktory jsou připravovány buď jako tekuté přípravky nebo ve formě prášku, získaného lyofilizací nebo jinou formou sušení. Jejich bezpečnost je zajištěna několika metodami; nejčastěji tepelným ošetřením (pasterizací při definované teplotě a délce trvání) nebo různými stupni filtrací (např. sterilizující filtrace) a testy vstupní suroviny na nepřítomnost patologických mikroorganismů. Výstupem všech dosud popsanych postupů je tekutá nebo prášková forma transfer faktorů, kterou lze aplikovat buď injekčně (podkožně nebo intravenózně) nebo jako perorálně podané přípravky (např. roztoky) do zažívacího traktu.

50

Biologická účinnost dosud vyráběných transfer faktorů je prokazována testováním *in vivo* na zvířecích modelech nebo *in vitro* sledováním jejich vlivu na cytokinové a jiné buněčné aktivity.

Vyráběné přípravky na bázi transfer faktorů vykazují tyto nevýhody:

- 5 - při injekčním podání mají velkou bolestivost, která je přímo úměrná aplikovaným objemům;
- parenterální přípravky musí být vyráběny jako sterilní přípravky;
- 10 - biologický účinek transfer faktorů, podávaných perorálně do zažívacího traktu, je snižován agresivním prostředím zažívacích orgánů.

Technické řešení řeší všechny tyto nevýhody modifikací technologie výroby a technologií přípravy transfer faktoru ve formě lyofilizované tablety definovaného složení.

15

Podstata technického řešení

Podstatou technického řešení je kit pro test biologické účinnosti transfer faktoru, popsany dále v kapitole „Test biologické účinnosti“ a v příkladu 3.

20

Způsob výroby zahrnuje následující technologické kroky:

25 a) Přípravu leukocytárního koncentrátu

b) Dialýza nebo ultrafiltrace

c) Odstranění soli a koncentrace nanofiltrací

30

d) Tepelná inaktivace

e) Formulace tablety

35 f) Příprava lyofilizované tablety

Tři technologické kroky: příprava leukocytárního koncentrátu (transport, skladování, příprava homogenátu), technologie přípravy účinné látky (dialýza nebo ultrafiltrace) a tepelná inaktivace probíhají dle současného stavu techniky.

40

Známým způsobem získaná účinná látka (dialyzát nebo ultrafiltrát) obsahuje vedle biologicky účinných složek velké množství balastu ve formě solí. Tyto sole mají buď fyziologický původ (přirozené komponenty krevních složek) nebo umělý (protisrážlivé látky, přidávané do krve při jejím odběru). Zároveň tento materiál obsahuje nežádoucí vysoký obsah vody.

45

Technické řešení spočívá zejména v zařazení následujících nových kroků při způsobu přípravy léčiva transfer faktor:

50 - odstranění přebytečných solí a přebytečného obsahu vody použitím technologie nanofiltrace přes membránu o vhodné porozitě;

- přípravu lyofilizované tablety obsahující transfer faktor jako účinnou látku;

55 - aplikaci účinné látky perorálně ve formě lyofilizované tablety, která se nepolyká a působí přes bukalní sliznici;

- test biologické účinnosti přípravku, založený na sledování proliferačního efektu na tkáňovou kulturu.

5 Popis jednotlivých kroků

Příprava leukocytárního homogenátu:

10 Leukocytární koncentráty od jednotlivých dárců jsou transportovány a skladovány ve zmraženém stavu. Po rozmražení při teplotě do +37 °C se surovina získaná od jednotlivých dárců spojuje do většího objemu. Práce musí probíhat ve výrobních prostorách s definovanou třídou čistoty prostředí. Následně se v leukocytárním homogenátu rozruší všechny membránové komponenty metodou opakovaného zmrazování a rozmrazování, popřípadě rozrušením buněk ultrazvukem, nebo kombinací obou postupů.

15

a1) Příprava homogenátu metodou zmrazení - rozmražení:

Zmrazování se provádí v lázni denaturovaného etylalkoholu při minimální teplotě -35 °C na rotačních zmrazovacích zařízeních. Rozmrazování se provádí ve vodní lázni při teplotě maximálně
20 +37 °C. Celý cyklus mrazení a rozmrazování se opakuje 6x. Po ukončení 6. cyklu se homogenát ponechaný v původních lahvích

uloží do mrazicího pultu při teplotě min. -17 °C do dalšího zpracování.

25 a2) Příprava homogenátu pomocí ultrazvuku:

Leukocytární homogenát se po rozmražení připraví rozrušením buněk ultrazvukem při 20 kHz po dobu 10 minut při teplotě +2 °C až +8 °C. Po této době dezintegrace se získaný homogenát uloží do mrazicího pultu při teplotě min. -17 °C až do dalšího zpracování.

30

a3) Příprava homogenátu kombinovanou metodou:

Jako alternativní postup výroby se používá kombinovaný postup homogenizace leukocytů. Cyklus zmrazení a rozmražení se opakuje 5 x s následnou dezintegrací ultrazvukem při 20 kHz po dobu
35 3 minut při teplotě +2 °C až +8 °C. Po této dezintegraci se získaný homogenát uloží do mrazicího pultu při teplotě min. -17 °C až do dalšího zpracování.

40

b) Dialýza

Zpracování leukocytárního homogenátu se provádí v uzavřeném systému na dialyzační koloně. V případě, že leukocytární homogenát byl před dalším zpracováním zmražen, rozmrazí se ve vodní
45 lázni max. +37 °C teplé. Teplota může být i nižší (do +4 °C). Je výhodou, pokud se od definované teploty neliší o více než +33 °C.

Dialýza homogenátu probíhá jako dialýza v uzavřeném systému.

50 Dialýza se provádí na dialyzační jednotce z umělé ledviny obsahující membránu, zadržující částice o relativní molekulové hmotnosti větší než 10 000. Dialýza se provádí za snížené teploty +2 °C až +8 °C. Tato teplota nemá být odlišná o více než 20 °C. Objem homogenátu leukocytárního koncentrátu zpracovaného v jednom cyklu se pohybuje s výhodou od 1,4 do 2,4 l. Neměl by být vyšší než desítky litrů a menší než 0,2 litru. Množství vody na injekci potřebné k dialýze
55 nízkomolekulárních látek v rozmezí teplot +2 °C až +8 °C se pohybuje v rozmezí 8 až 13 l. Toto

množství vody může být při použití jiných teplot různé, nemělo by být v jiném objemovém řádu, než jsou litry.

Je výhodou, pokud při vlastním průběhu dialýzy dezintegrovat leukocytární koncentrát pomocí čerpadla koluje přes dialyzační jednotku okruhem o průtoku 1,2 až 2,0 l / hod. a voda na injekci jako dialyzační medium přes stejnou dialyzační jednotkou druhým okruhem rychlostí 0,4 až 0,5 l/hod. Za těchto podmínek se pohybuje doba dialýzy v rozmezí 24 hodin $\pm$ 4 hod. Pokud jsou v procesu použité jiné cirkulační rychlosti, musí se úměrně upravit i doba dialýzy. Dialýza se ukončí, když hodnota absorpance dialyzátu klesne pod 0,6 při 260 nm. Tato hodnota je doporučená, může být i odlišná.

Obdobným způsobem lze postupovat v případě, že je dialýza nahrazena ultrafiltrací.

c) Odstranění solí a koncentrace nanofiltrací

V tomto výrobním kroku se získaný dialyzát zbavuje nežádoucích solí a zároveň se koncentruje nanofiltrací na požadovaný objem. V tomto výrobním kroku jde především o to, že získaný dialyzát, který obsahuje pro další zpracování příliš velký objem solí a vody musí být odsolen a zakonzentrován tak, aby byl přímo použitelný pro konstrukci lyofilizované tablety, tedy bez další nutnosti dořezávání nebo zahušťování nebo obohacování nebo jakékoliv jiné dodatečné úpravy získaného roztoku. Metody zahušťování mohou být různé. Použitá metoda řeší dva technologické požadavky: šetrným postupem zbavuje produkt solí a nežádoucího nadměrného objemu vody. Proti tepelnému namáhání je produkt chráněn chlazením celého procesu. Teplota při nanofiltraci by neměla překročit +30 °C a je výhodou, když se tato teplota, pohybuje v rozsahu 14 až 25 °C a zpracovávaný objem tekutiny není větší než 50 litrů a menší než 5 litrů. Ideální objem se pohybuje kolem 15 litrů. Pracovní tlak na filtru je 20 bar $\pm$ 5 bar (2 MPa $\pm$ 0,5 MPa). Vždy je třeba se vyhnout statickému protitlaku na straně permeátu. Filtrace se provádí systémem maximálního oddělení permeátu z filtrovaného vzorku. Zbývající vzorek je ve filtračním zařízení přímo naředěný demineralizovanou vodou v množství odebraného permeátu. Po promíchání takto naředěné tekutiny následuje vlastní filtrace. Tento postup se opakuje 4x. Pro nanofiltraci se s výhodou používá polyamidový tenkovrstvý kompozit jako membrána o porozitě umožňující propustnost do 1000 Da. Předmětem patentové ochrany v tomto výrobním kroku je krok odstranění přebytečných solí a vody popsanou metodou nanofiltrace.

d) Tepelná inaktivace

Pro bezpečnost produktu je třeba zajistit jeho inaktivaci. Transfer faktor je tepelně inaktivován pasterizací při +60 °C po dobu 10 hodin ve vodní lázni. Popsaný postup zaručuje, že produkt je bezpečný a zároveň je natolik šetrný, že nezpůsobí jeho poškození. Tento technologický krok probíhá rovněž dle současného stavu techniky.

e) Formulace matrice tablety

Z hlediska obsahu zahušťovadel a plnidel má tableta toto definované složení:

Formulace jedné tablety reprezentuje tyto komponenty:

Dextranum 40 (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	0,05 g
Iota karagenan (β -D-galaktosa-4-sulfát; 3,6-anhydrid- α -D-galaktosa-2-sulfát)	0,0015 g
Macrogolum 300 (Polyethylenglycolum 300)	0,005 g

Saccharinumnatricum 0,0003333 g
(Sodná sůl 1,1-dioxid-1,2-benzothiazol-3(2H)-onu; C₇H₄NNaO₃S)

5 Účinná látka (transfer faktor) 1 léčivá dávka

Aqua purificata ad 0,5 g

10 Vlastní příprava tablet:

Předem se připraví roztok účinné látky (transfer faktoru) tak, aby jedna dávka byla rozpuštěna v 0,25 ml vody v kvalitě „voda pro injekce“.

15 Následuje příprava vlastní matrice:

0,0015 g karagenanu iota se rozpustí za zvýšené teploty ve vodní lázni (60 °C) v 0,17 g čištěné vody. K tomuto roztoku se přidá 0,05 g dextranu 40 a mícháním se rozpustí. K urychlení rozpouštění dextranu lze použít ultrazvukovou lázeň po dobu 1 min nebo lze směs udržovat mírně zahřátou ve vodní lázni (40 °C).

Po ochlazení na laboratorní teplotu se přidá 0,005 g makrogolu 300 a 0,0003 g sodné soli sacharinu, doplní se čištěnou vodou na 0,25 g a míchá se do rozpuštění všech složek. Následně se matrice smísí s předem připraveným roztokem TFI. Následuje dávkování po 0,5 ml do blistru, který slouží jako primární obal lyofilizované tablety. Předmětem technického řešení v tomto výrobním kroku je matrice tablety.

30 f) Příprava lyofilizované tablety

Dle předpisu pro formulaci jedné tablety se připraví roztok matrice tablet a vhodným dávkovacím zařízením se tento roztok rozplní přímo do jednotlivých jamek blistrů po 0,5 ml.

35 Před rozplněním přípravku do blistrů se lyofilizační zařízení nastaví do modu vymražení desek do nadefinované teploty -50 °C. Vymražení desek do této teploty proběhne do cca 2 hodin.

Po dosažení požadované teploty -50 °C se na vymražené desky lyofilizačního zařízení založí blistry s rozplněným materiálem. Následně se lyofilizační zařízení přepne do modu primárního sušení (sublimace), nastaví se hodnoty pro vymražení kondenzátoru na hodnotu -55 °C a hodnotu vakua na 0,3 mbar (30 Pa). Po dosažení nastavené teploty kondenzátoru -55 °C se spustí lyofilizační proces.

Lyofilizační sušící proces lze nastavit v automatickém nebo poloautomatickém režimu.

45 V automatickém režimu nelze zasahovat do nastavených parametrů po celou dobu lyofilizace, poloautomatický režim umožňuje v případě potřeby upravovat a přepínat jednotlivé fáze (vymražení, primární sušení, sekundární sušení) ručním ovládáním. Po 2 hodinách se proces lyofilizace mění do modu sekundárního sušení (desorbce).

50 Teplota desek se nastaví na hodnotu -30 °C, vakuum na 0,005 mbar (0,5 Pa).

V dalším postupu se teplota desek vždy po 1 hodině snižuje postupně na -20 °C, -10 °C, 0 °C, +10 °C a +25 °C. Celý lyofilizační proces se ukončí maximálně do 24 hodin od jeho zahájení. Reálný čas ukončení lyofilizace se odvíjí od dosažení popsanych teplotních hodnot desek a hodnot vakua. Po ukončení lyofilizace se lyofilizační zařízení zavzdušní, blistry s vysušeným produktem

se vyjmou a na blistrovacím zařízení uzavřou zatahovací krycí fólií. Předmětem technického řešení v tomto výrobním kroku je forma lyofilizované tablety.

Výše uvedeným způsobem je připraveno léčivo transfer faktor, z leukocytů periferní krve, obsahující bílkovinné složky a složky nukleových kyselin, jejichž poměr v léčivu vyjadřuje index absorbance, což je poměr získaný spektrofotometrickým měřením absorbance v UV oblasti při 260 nm a 280 nm. Tento index nesmí mít hodnotu menší než 1,7 s výhodou v rozpětí 1,7 až 2,1. Léčivo je zbavené balastních solí metodou nanofiltrace. Žádná ze složek léčiva nemá molekulovou hmotnost větší než 10 000 daltonů.

Léková forma podání je lyofilizovaná tableta. V jedné lyofilizované tabletě je obsažena jedna léčivá dávka přípravku, která představuje množství biologicky aktivních látek získaných z cca 200 milionů periferních leukocytů, schopných normalizovat porušenou buněčnou imunitu příjemce. Lyofilizovaná tableta se vyrábí lyofilizací tekuté matrice. Tekutá matrice se vyznačuje hodnotou osmolality v rozpětí 150 až 400 mmol/kg. V lyofilizované tabletě lze prokázat účinnost biologicky aktivních látek.

Test biologické účinnosti

Test biologické účinnosti je založený na sledování účinku transfer faktoru na viabilitu modelové buněčné linie po jejím předchozím ovlivnění imunosupresivní látkou azathioprinem.

Jako modelová buněčná linie se používá immortalizovaná T-lymfocytární buněčná linie Jurkat CCL-81. Viabilita buněk je měřena na průtokovém cytometru s použitím komerčního MTT testu. MTT měří metabolickou aktivitu buněk a je tak vhodný pro stanovení buněčné viability. Test je založen na redukci tetrazoliové soli MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) na nerozpustný formazan. Množství vytvořeného formazanu je pak přímo úměrné počtu živých buněk.

Buněčná linie Jurkat je kultivována v RPMI médiu obohaceném 10 % fetálního bovinního séra, 2 mM glutaminu a směsi penicilin (100 I/ml)-streptomycin (100 µg/ml). Pro supresi modelové buněčné linie se použije azathioprin o koncentraci 5 µg/ml.

Pro test biologické účinnosti se přidá transfer faktor ředěný 80 až 160krát. Inkubace buněk probíhá po dobu 72 h. Po této době inkubace se ke každé jamce v destičce přidá 20 µl zásobního roztoku MTT (5 mg/ml) a destička je nadále inkubována 3 h při 37 °C. Poté se odstraní supernatant a vytvořené krystalky formazanu se solubilizují ve 150 µl dimethylsulfoxidu. Výsledná optická denzita roztoků se měří při 570 nm na destičkovém spektrofotometru a vyhodnocuje se jako viabilita buněk.

Při vlastním testu je výhodné použít tyto srovnávací skupiny:

Kontrolní skupina - samotné neovlivněné Jurkat buňky;
Jurkat buňky suprimované azathioprinem;
Jurkat buňky ovlivněné transfer faktorem;
Jurkat buňky suprimované azathioprinem a následně ovlivněné transfer faktorem.

Vyhodnocení výsledků:

Přidaný samotný transfer faktor nijak neovlivní viabilitu buněk oproti kontrolní skupině. Vzhledem ke kontrole přidaný azathioprin sníží viabilitu buněk pod 50 % hodnoty kontrolní skupiny.

Transfer faktor v kombinaci s azathioprinem vrátí viabilitu buněk potlačenou azathioprinem o cca 40 % směrem zpět k normálu.

Předmětem technického řešení v tomto výrobním kroku je *in vitro* test biologické účinnosti transfer faktoru.

5

Použití

Technické řešení je využitelné při komerční přípravě jakéhokoliv transfer faktoru, specifického i nespecifického, připraveného z homogenátu leukocytů periferní krve. Technické řešení je
10 využitelné jak při výrobě humánního přípravku, tak i u modifikací určených pro veterinární použití. Předmětem ochrany je i doporučené podání transfer faktoru, které spočívá v podání lyofilizované tablety do oblasti bukalní sliznice.

Podání transfer faktoru v této formě zabrání spolknutí tablety, v průběhu několika sekund dojde
15 k jejímu rozpuštění na sliznici.

Hlavní terapeutický efekt je tak zprostředkovaný průnikem léčiva pouze přes ústní sliznici.

20 Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1

Způsob přípravy léčiva transfer faktor

25

- a) Přípravu leukocytárního koncentrátu
- b) Dialýza nebo ultrafiltrace
- c) Odstranění solí a koncentrace nanofiltrací
- d) Tepelná inaktivace
- 30 e) Formulace tablety
- f) Příprava lyofilizované tablety

a) Příprava leukocytárního koncentrátu

35 Leukocytární koncentráty jsou uskladněny ve zmraženém stavu. Následně se při teplotě max. +37 °C leukocytární koncentrát spojí do pracovního objemu. Práce musí probíhat ve výrobních prostorách s definovanou třídou čistoty „C“ prostředí. Následně se v leukocytárním homogenátu rozruší všechny membránové komponenty metodou opakovaného zmrazování a rozmrazování, popřípadě rozrušením buněk ultrazvukem, nebo kombinací obou postupů.

40

a 1) Příprava homogenátu metodou zmrazení - rozmrazení:

Zmrazování se provádí v lázni denaturovaného etylalkoholu při minimální teplotě -35 °C na rotačních zmrazovacích zařízeních.

45

Rozmrazování se provádí ve vodní lázni při teplotě maximálně +37 °C. Celý cyklus mrazení a rozmrazování se opakuje 6x. Po ukončení 6. cyklu se homogenát ponechaný v původních lahvích uloží do mrazicího pultu při teplotě min. -17 °C do dalšího zpracování.

50

a 2) Příprava homogenátu pomocí ultrazvuku:

Leukocytární homogenát se po rozmrazení připraví rozrušením buněk ultrazvukem při 20 kHz po dobu 10 minut při teplotě +2 °C až + 8 °C. Po této době dezintegrace se získaný homogenát uloží do mrazicího pultu při teplotě min. - 17 °C až do dalšího zpracování.

55

a 3) Příprava homogenátu kombinovanou metodou:

Jako alternativní postup výroby se používá kombinovaný postup homogenizace leukocytů. Cyklus zmrazení a rozmrazení se opakuje 5x s následnou dezintegrací ultrazvukem při 20 kHz po dobu 3 minut při teplotě +2 °C až +8 °C. Po této dezintegraci se získaný homogenát uloží do mrazicího pultu při teplotě min. -17 °C až do dalšího zpracování.

U všech teplot uváděných v tomto výrobním kroku by neměl být jejich výkyv větší než 30 °C na obě strany teplotní stupnice a čas by neměl být jiný než v řádu minut.

b) Dialýza

Zpracování leukocytárního homogenátu se provádí v uzavřeném systému na dialyzační koloně. V případě, že leukocytární homogenát byl před dalším zpracováním zmrazen, rozmrazí se ve vodní lázni max. + 37 °C teplé. Teplota může být i nižší (do + 4 °C). Je výhodou, pokud se od definované teploty neliší o více než 20 °C.

Dialýza se provádí na dialyzační jednotce z umělé ledviny obsahující membránu, zadržující částice o relativní molekulové hmotnosti větší než 10 000. Dialýza se provádí za snížené teploty +2 °C až +8 °C. Tato teplota nemá být odlišná o více než 20 °C. Objem homogenátu leukocytárního koncentrátu zpracovaného v jednom cyklu se pohybuje s výhodou od 1,4 do 2,4 l. Neměl by být vyšší než desítky litrů a menší než 0,2 litru. Množství vody na injekci potřebné k dialýze nízkomolekulárních látek v rozmezí teplot +2 °C až +8 °C se pohybuje v rozmezí 8 až 13 l.

Toto množství vody může být při použití jiných teplot různé, nemělo by být v jiném objemovém řádu, než jsou litry.

Je výhodou, pokud při vlastním průběhu dialýzy dezintegrován leukocytární koncentrát pomocí čerpadla koluje přes dialyzační jednotku okruhem o průtoku 1,2 až 2,0 l/hod. a voda na injekci jako dialyzační medium přes stejnou dialyzační jednotkou druhým okruhem rychlostí 0,4 až 0,5 l/hod. Za těchto podmínek se pohybuje doba dialýzy v rozmezí 24 hodin ± 4 hod. Pokud jsou v procesu použité jiné cirkulační rychlosti, musí se úměrně upravit i doba dialýzy. Dialýza se ukončí, když hodnota absorpance dialyzátu klesne pod 0,6 při 260 nm. Tato hodnota je doporučená, může být i odlišná.

Obdobným způsobem lze postupovat v případě, že je dialýza nahrazena ultrafiltrací.

c) Odstranění solí a koncentrace nanofiltrací

V tomto výrobním kroku se získaný dialyzát zbavuje nežádoucích solí a zároveň se koncentruje nanofiltrací na požadovaný objem.

Cílem je, aby dialyzát, který obsahuje pro další zpracování příliš velký objem solí a vody, byl odsolen a zakonzentrován tak, aby byl přímo použitelný pro konstrukci lyofilizované tablety. Proti tepelnému namáhání je produkt chráněn chlazením celého procesu. Teplota při nanofiltraci by neměla překročit +30 °C a je výhodou, když se tato teplota, pohybují v rozsahu 14 až 25 °C a zpracováváný objem tekutiny není větší než 50 litrů a menší než 5 litrů. Ideální objem se pohybuje kolem 15 litrů. Pracovní tlak na filtru je 20 bar ± 5 bar (2 MPa ± 0,5 MPa). Vždy je třeba se vyhnout statickému protitlaku na straně permeátu. Filtrace se provádí systémem maximálního oddělení permeátu z filtrovaného vzorku. Zbývající vzorek je ve filtračním zařízení přímo naředěn demineralizovanou vodou v množství odebraného permeátu. Po promíchání takto naředěné tekutiny následuje vlastní filtrace. Tento postup se opakuje 4x. Pro nanofiltraci se s výhodou používá polyamidový tenkovrstvý kompozit jako membrána o porozitě umožňující propustnost do 1000 Da.

d) Tepelná inaktivace - tento technologický krok probíhá rovněž dle současného stavu techniky.

Pro bezpečnost produktu je třeba zajistit jeho inaktivaci. Transfer faktor je tepelně inaktivován pasterizací při +60 °C po dobu 10 hodin ve vodní lázni. Popsaný postup zaručuje, že produkt je bezpečný a zároveň je natolik šetrný, že nezpůsobí jeho poškození.

e) Formulace tablety

Velikost šarže (120 tablet)

Dextranum 40	6,0 g
Iota karrageenan	0,18 g
Macrogolum 300	0,6 g
Saccharinum natricum	0,04 g
TFI	30 dávek
Aqua purificata	ad 60,0 g

Předem se připraví roztok transfer faktoru (30 dávek) v 30 ml čištěné vody (případně vody na injekci). Následně se připraví matrice: 0,18 g karagenanu iota se rozpustí za zvýšené teploty ve vodní lázni (60 °C) v 20 g čištěné vody (odpovídá celkovému množství vzorku 60 g k přípravě 120 tablet). K tomuto roztoku se přidá 6,0 g dextranu 40 a mícháním se rozpustí. K urychlení rozpouštění dextranu lze použít ultrazvukovou lázeň po dobu 1 min nebo lze směs udržovat mírně zahřátou ve vodní lázni (40 °C).

Po ochlazení na laboratorní teplotu se přidá 0,6 g makrogolu 300 a 0,04 g sodné soli sacharinu, doplní se čištěnou vodou na 30,0 g a míchá se do rozpuštění všech složek. Vzniklá matrice se smísí s roztokem transfer faktoru

f) Příprava lyofilizované tablety

Přípravená tekutá matrice tablet, obsahující účinnou látku transfer faktor se automatickou dávkovačí pipetou rozplní do jednotlivých jamek blistrů po 0,5 ml. Před rozplněním přípravku TFI do blistrů se lyofilizátor nastaví do modu funkce mražení - vymražení desek do definované teploty -50 °C. Toto vymražení desek proběhne za cca 2 hodiny.

Po dosažení požadované teploty se založí blistry s rozplněnou matricí tablet na vymražené desky, lyofilizátor se přepne do modu primárního sušení (sublimace), nastaví se definované hodnoty pro vymražení kondenzátoru na hodnotu -55 °C a hodnota vakua na 0,3 mbar (30 Pa). Po dosažení nastavené teploty kondenzátoru se spustí lyofilizační proces. Lyofilizační proces lze nastavit v automatickém nebo poloautomatickém režimu. V automatickém režimu nelze zasahovat do nastavených parametrů po celou dobu lyofilizace. Poloautomatický režim umožňuje upravovat a přepínat jednotlivé fáze ručním ovládáním (vymražení, primární sušení, sekundární sušení).

Po cca 2 hodinách přechází lyofilizace do modu sekundárního sušení (desorbce), teplota desek se nastaví na -30 °C, vakuum na 0,005 mbar (0,5 Pa). Následně se teplota desek postupně v intervalech po 1 hodině snižuje na -20 °C, -10 °C, 0 °C, +10 °C a +25 °C.

Lyofilizační proces se ukončí maximálně do 24 hodin, čas ukončení lyofilizace se odvíjí od dosažení nastavených hodnot desek a vakua.

Po ukončení lyofilizace se lyofilizátor zavzdušní, blistry s lyofilizátem se vyjmou a na blistrovacím zařízení zakryjí fólií. Použité lyofilizační zařízení: LYOBETA 15.

Příklad 2

Léčivo transfer faktor

- 5 Výše uvedeným způsobem je připraveno léčivo transfer faktor, z leukocytů periferní krve, obsahující bílkovinné složky a složky nukleových kyselin, jejichž poměr v léčivu vyjadřuje index absorbance, což je poměr získaný spektrofotometrickým měřením absorbance v UV oblasti při 260 nm a 280 nm. Tento index nesmí mít hodnotu menší než 1,7 s výhodou v rozpětí 1,7 až 2,1. Léčivo je zbavené balastních solí metodou nanofiltrace. Žádná ze složek léčiva nemá molekulovou
- 10 hmotnost větší než 10 000 daltonů.

Příklad 3

Metodika testování biologické účinnosti léčiva podle popsání technického řešení

15 Test biologické účinnosti

- Pro měření viability byl použitý průtokový cytometr Guava EasyCyte, Luminex, USA a komerční MTT test Sigma-Aldrich, USA. Pro stanovení viability buněčné linie byl použit kit Guava-ViaCount, Luminex, USA, který rozlišuje živé a mrtvé buňky na principu rozdílné permeability
- 20 buněčné membrány pro DNA-vázající značky. Buněčná linie Jurkat byla kultivována v RPMI médiu obohaceném 10 % fetálního bovinního séra, 2 mM glutaminu a směsi penicilin (100 I/ml)-streptomycin (100 µg/ml).

- Pro test biologické účinnosti se použije transfer faktor ředěný 80 až 160krát. Inkubace buněk probíhá 72 h. Po této době inkubace se ke každé jamce v destičce přidá 20 µl zásobního roztoku MTT (5 mg/ml) a destička je nadále inkubována 3 h při 37 °C. Poté se odstraní supernatant a vytvořené krystalky formazanu se solubilizují ve 150 µl dimethylsulfoxidu. Výsledná optická
- 25 denzita roztoků se měří při 570 nm na destičkovém spektrofotometru a vyhodnocuje se jako viabilita buněk. Optická denzita roztoku byla měřena při 570 nm na destičkovém spektrofotometru (Beckman Coulter, USA).
- 30

Při vlastním testu je výhodné použít tyto srovnávací skupiny:

Kontrolní skupina - samotné neovlivněné Jurkat buňky;

Jurkat buňky suprimované azathioprinem;

- 35 Jurkat buňky ovlivněné transfer faktorem;

Jurkat buňky suprimované azathioprinem a následně ovlivněné transfer faktorem.

Vyhodnocení výsledků:

Přidaný samotný transfer faktor nijak neovlivní viabilitu buněk oproti kontrolní skupině.

- 40 Vzhledem ke kontrole přidaný azathioprin snižuje viabilitu buněk pod 50 % hodnoty kontrolní skupiny.

Transfer faktor v kombinaci s azathioprinem vrátí viabilitu buněk potlačenou azathioprinem o cca 40 % směrem zpět k normálu.

45 Příklad 4

Léková forma

- Léková forma podání, kterou je lyofilizovaná tableta. V jedné lyofilizované tabletě je obsažena
- 50 jedna léčivá dávka přípravku, která představuje množství biologicky aktivních látek získaných z cca 200 milionů periferních leukocytů, schopných normalizovat porušenou buněčnou imunitu příjemce. Lyofilizovaná tableta se vyrábí lyofilizací tekuté matrice. Tekutá matrice se vyznačuje hodnotou osmolality v rozpětí 150 až 400 mmol/kg. V lyofilizované tabletě lze prokázat účinnost biologicky aktivních látek.

55

Léková forma je připravena způsobem:

Dle předpisu pro formulaci jedné tablety se připraví roztok matrice tablet a vhodným dávkovacím zařízením se tento roztok rozplní přímo do jednotlivých jamek blistrů po 0,5 ml.

5

Před rozplněním přípravku do blistrů se lyofilizační zařízení nastaví do modu vymražení desek do nadefinované teploty -50 °C. Vymražení desek do této teploty proběhne do cca 2 hodin.

10

Po dosažení požadované teploty -50 °C se na vymražené desky lyofilizačního zařízení založí blistry s rozplněným materiálem. Následně se lyofilizační zařízení přepne do modu primárního sušení (sublimace), nastaví se hodnoty pro vymražení kondenzátoru na hodnotu -55 °C a hodnotu vakua na 0,3 mbar (30 Pa). Po dosažení nastavené teploty kondenzátoru -55 °C se spustí lyofilizační proces.

15

Lyofilizační sušící proces lze nastavit v automatickém nebo poloautomatickém režimu.

20

V automatickém režimu nelze zasahovat do nastavených parametrů po celou dobu lyofilizace, poloautomatický režim umožňuje v případě potřeby upravovat a přepínat jednotlivé fáze (vymražení, primární sušení, sekundární sušení) ručním ovládáním. Po 2 hodinách se proces lyofilizace mění do modu sekundárního sušení (desorbce).

25

Teplota desek se nastaví na hodnotu -30 °C, vakuum na 0,005 mbar (0,5 Pa).

V dalším postupu se teplota desek vždy po 1 hodině snižuje postupně na -20 °C, -10 °C, 0 °C, +10 °C a +25 °C. Celý lyofilizační proces se ukončí maximálně do 24 hodin od jeho zahájení.

Reálný čas ukončení lyofilizace se odvíjí od dosažení popsaných teplotních hodnot desek a hodnot vakua. Po ukončení lyofilizace se lyofilizační zařízení zavzdušní, blistry s vysušeným produktem se vyjmou a na blistrovacím zařízení uzavřou zatavovací krycí fólií. Předmětem technického řešení v tomto výrobním kroku je forma lyofilizované tablety.

30

Výše uvedeným způsobem je připraveno léčivo transfer faktor, z leukocytů periferní krve, obsahující bílkovinné složky a složky nukleových kyselin, jejichž poměr v léčivu vyjadřuje index absorbance, což je poměr získaný spektrofotometrickým měřením absorbance v UV oblasti při 260 nm a 280 nm. Tento index nesmí mít hodnotu menší než 1,7 s výhodou v rozpětí 1,7 až 2,1. Léčivo je zbavené balastních solí metodou nanofiltrace. Žádná ze složek léčiva nemá molekulovou

35

hmotnost větší než 10 000 daltonů.

Příklad 5

40

Použití lékové formy

a) Použití transfer faktoru podle tohoto technického řešení jako lékové formy lyofilizované tablety k podání do ústní dutiny, při kterém lyofilizovaná tableta bezprostředně adhezuje ke sliznici, tím je zabráněno jejímu polknutí a je rychle na bukalní sliznici rozpuštěna, přičemž se nedostane se přímo do trávicího systému.

45

b) Použití transfer faktoru podle tohoto technického řešení jako humánního nebo veterinárního léčiva.

50

c) Použití transfer faktoru podle tohoto technického řešení jako humánního nebo veterinárního doplňku stravy.

55

d) Použití transfer faktoru podle tohoto technického řešení jako humánního nebo jako veterinárního přípravku k nápravě chorobných stavů souvisejících s poruchou buněčné imunity, tedy chronické infekce, septické stavy, atopický ekzém, recidivující mykózy, psoriázy imunodeficiencie spojené s onkologickou léčbou.

e) Použití transfer faktoru podle tohoto technického řešení jako humánního nebo veterinárního profylaktického přípravku.

5

Průmyslová využitelnost

Technické řešení je využitelné při komerční přípravě jakéhokoliv transfer faktoru, specifického i nespecifického, připraveného z leukocytů periferní krve. Technické řešení je dále použitelné jak při výrobě humánního léčivého přípravku, tak i u léčivých přípravků určených pro veterinární použití. Technické řešení je využitelné při komerční přípravě jakéhokoliv transfer faktoru, specifického i nespecifického, využitelného jako součást doplňků stravy. Přípravek získaný postupem přípravy podle tohoto technického řešení je použitelný u chorobných stavů souvisejících s poruchou buněčné imunity (chronické: infekce, septické stavy, atopický ekzém, recidivující mykózy, psoriázy; imunodeficiencie spojené s onkologickou léčbou). Přípravek je použitelný i profylakticky. Doporučené podání: lyofilizovaná tableta je vložena do úst, kde dojde k jejímu ulpění na sliznici a k rychlému rozpuštění. Tableta se nepolyká.

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Kit pro test biologické účinnosti transfer faktoru, **vyznačující se** tím, že obsahuje suspenzi Jurkat buněk ve třech variantách:
- Jurkat buňky suprimované azathioprinem a
 - Jurkat buňky ovlivněné transfer faktorem a
 - 10 - Jurkat buňky suprimované azathioprinem a následně ovlivněné transfer faktorem,
- příčemž dále obsahuje roztok tetrazoliové soli MTT, kde MMT představuje sloučeninu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid.