

COMPOSICIÓN OFTÁLMICA DE BEVACIZUMAB

CAMPO DE LA INVENCION:

La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología y la administración de fármacos. En particular, la presente invención se refiere a una composición oftálmica de bevacizumab y a un dispositivo que comprende dicha composición.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION:

Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante que contiene regiones estructurales humanas y las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo murino que se une e inhibe la actividad biológica del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF). Bevacizumab tiene licencia para tratar varios tipos de cáncer, incluido el colorrectal metastásico (mCRC), cáncer de pulmón no microcítico no escamoso (NSCLC), cáncer de mama metastásico (MBC), carcinoma metastásico de células renales (mRCC), glioblastoma y cáncer de cuello uterino en etapa tardía. En estas indicaciones, bevacizumab ha demostrado su eficacia en términos de seguridad y supervivencia del paciente. Además, también se usa como medicamento no aprobado para tratar la degeneración macular húmeda relacionada con la edad (wAMD), la neovascularización coroidea (CNV), el edema macular diabético (DME), la oclusión de la vena retiniana (RVO) y el glaucoma neovascular (NVG). Alternativamente, también está en el mercado otro anticuerpo monoclonal, ranibizumab, un fármaco aprobado por la USFDA para wAMD, CNV, DME, etc. Aunque parece que no hay diferencia en la eficacia y seguridad, entre bevacizumab y ranibizumab demostrado por varios estudios, existe una enorme ventaja de costo si se usa bevacizumab en lugar de ranibizumab.

Como bevacizumab está aprobado para el cáncer y está disponible en viales de 100 mg o 400 mg para proporcionar la dosis completa para un individuo de acuerdo con el peso corporal. Cuando se usa Bevacizumab para la DMAE, los oftalmólogos típicamente inyectan una cantidad mucho más pequeña, tan baja como 1.25 mg por dosis intravítrea, probablemente repetidamente desde el vial pequeño (uso de dosis múltiples). Cualquier fármaco destinado a la administración intravítrea debe prepararse y mantenerse en un entorno estéril. Existe riesgo de contaminación cuando la inyección se preparara en el vial mediante el aspirado de la solución reconstituida en el dispositivo antes de la administración. Un fármaco contaminado pone al paciente en riesgo de varias infecciones adicionales, tal como endoftalmitis, infección

por estreptococo alfa hemolítico. En algunas partes del mundo, los propios médicos aspiran el fármaco necesario del vial original y el mismo vial se usa para muchos pacientes consecutivos, lo que ha demostrado ser una práctica incorrecta en el contexto de la seguridad del paciente porque el número creciente de pinchazos del mismo vial aumenta las posibilidades de contaminación e infección a los pacientes. Además, puede haber imprecisiones en la dosis debido a errores humanos por parte del personal médico o paramédico que administra.

En algunos países, las farmacias de compuestos vuelven a empaquetar varias jeringas del vial original. La necesidad de volver a envasar el medicamento del vial de tamaño disponible en una dosis más pequeña aumenta la probabilidad de transmisión de la contaminación, especialmente porque es difícil mantener las condiciones asépticas durante tales procedimientos y no hay forma de verificar si tales procedimientos se están siguiendo en las farmacias de compuestos. La FDA ha documentado y emitido avisos de advertencia en varios casos con respecto al uso de técnicas asépticas y control de dosis de estas farmacias de compuestos, pero tales prácticas siguen siendo rampantes. Además, varias farmacias de compuestos han retirado jeringas re envasadas de bevacizumab debido a problemas de esterilidad y la FDA de EE.UU ahora advierte al equipo médico y paramédico contra la utilización de inyecciones de bevacizumab re-empaquetadas para uso intraocular. Además de eso, bevacizumab se fabrica para administración intravenosa y, por lo tanto, el criterio para la distribución de tamaño de partícula es crítico. Si la partícula no se controla, creará irritación y/o inflamación en un órgano sensible como el ojo. Se ha informado que, para tales soluciones oftálmicas inyectables reenvasadas, la distribución del tamaño de partícula se encuentra fuera de los límites establecidos por la Farmacopea de los EE.UU y generalmente no estandarizado ni homologado para las diferentes farmacias de compuestos.

Además de los problemas de seguridad, el medicamento en sí puede tener una eficacia variable asociada con la alícuota, el manejo y la distribución del producto. El deterioro también puede estar sujeto al empaque particular usado, y la estabilidad reducida del bevacizumab reenvasado puede estar asociada con la duración del almacenamiento. Además de las posibles implicaciones de seguridad de estos cambios, la eficacia del fármaco también puede verse afectada. Además, la estabilidad de almacenamiento del bevacizumab reenvasado también es una preocupación principal y las pautas emitidas por DCGI de la India con respecto al reenvasado de bevacizumab, se recomienda usar jeringas de bevacizumab reenvasadas no más

de 14 días en condiciones específicas, para evitar la degradación y la desnaturalización. Pero no existe un mecanismo efectivo para determinar y examinar el límite de tiempo después de la reconstitución y/o desnaturalización o degradación en el período de almacenamiento. La reconstitución adicional del producto envasado para su administración es un procedimiento complejo y engorroso y puede que no siempre resulte en una solución homogénea. Además, hay informes en los que el Avastin falsificado adicionalmente se rastrea a nivel internacional, lo que ha resultado ser cada vez más desafiante, ya que las cadenas de suministro globales se han vuelto más complejas.

Ciertas cuestiones relacionadas con la preparación magistral de bevacizumab en pequeñas unidades para el uso intravítreo y la falsificación de bevacizumab pueden reducirse mediante la implementación de pautas regulatorias estrictas, pero los problemas del estado de la técnica, como el límite de endotoxinas bacterianas (BET) y el límite de ensayo de partículas (PMT), necesitan soluciones técnicas específicas y control de fabricación para eliminar los problemas del estado de la técnica y para proporcionar un producto aceptable para inyecciones intravítreas oftálmicas.

Cada vez hay más informes de eventos adversos asociados con la inyección intravítrea de bevacizumab, que incluyen incidencias de inflamación estéril intraocular, endoftalmitis infecciosa y presión intraocular elevada. Ciertos eventos adversos informados asociados con la administración intravítrea de bevacizumab pueden estar relacionados con la forma en que se fabrica o con el deterioro de la calidad del medicamento debido al reenvasado en jeringas de plástico. Además de eso, las gotas de silicona que provienen de las agujas y jeringas usadas para las inyecciones intravítreas empeoran la condición.

Hay problemas relacionados con la calidad del producto de estado de la técnica de producto anterior como se indica más abajo:

- Bevacizumab actualmente solo cumple con los estándares de calidad intravenosos, en lugar de los estándares oftálmicos más estrictos con respecto a los niveles de endotoxinas y partículas subvisibles.
- La presencia de partículas subvisibles y/o aceite de silicona es fundamental en el caso de una inyección intravítrea (acumulación en el ojo, que puede provocar una inflamación intraocular grave).

- No se presentan datos para considerar la calidad del producto después del reenvasado desde un punto de vista microbiológico así como también fisicoquímico. Tampoco se considera la compatibilidad de la solución con el envase primario.
- No se ha realizado un examen del entorno de vida útil del bevacizumab reenvasado y el impacto en la seguridad y la calidad en la mayor parte del mundo.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de una composición oftálmica para Bevacizumab que sea segura, no tóxica y eficaz para la administración de un solo uso con una vida útil prolongada.

OBJETIVO DE LA INVENCION:

Un objetivo de la invención es proporcionar una composición oftálmica de Bevacizumab con partículas controladas, endotoxina bacteriana, agregado durante la vida útil, un proceso para preparar la composición y un dispositivo para la administración de la composición que sea seguro, no tóxico y eficaz, para la administración de un solo uso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION:

La presente invención divulga una composición oftálmica de Bevacizumab, que se administra como una jeringa pre cargada de un solo uso. La composición oftálmica de la presente invención controla el límite del ensayo de endotoxinas bacterianas (BET), las partículas y los agregados durante el período de su vida útil de 2 años. La presente invención también proporciona un proceso para obtener el ingrediente activo, siendo bevacizumab con una cantidad insignificante o nula de ensayo de endotoxina bacteriana (BET) y partículas y allí la composición de la presente invención cuando se formula tiene un nivel muy bajo de agregado, BET y partículas durante el período de su vida útil y adecuado para el uso intravítreo. La invención también proporciona un dispositivo como una jeringa pre cargada o un kit que comprende la composición oftálmica de bevacizumab.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS:

La figura 1 muestra la representación esquemática de la obtención de la composición oftálmica de la presente invención controlada con respecto al número de partículas subvisibles, bajos niveles de endotoxinas durante la vida útil del producto.

La figura 2a y la figura 2b representan el tamaño de partícula subvisible de la muestra de la presente invención en comparación con el de las otras muestras de estado de la técnica anterior.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION:

- 5 Una composición oftálmica de Bevacizumab que es segura, no tóxica y eficaz para la administración durante la vida útil, caracterizada porque la composición oftálmica está controlada con respecto al número de partículas subvisibles, baja endotoxina niveles de agregados, durante la vida útil del producto.
- 10 La composición oftálmica de la presente invención es preferentemente una solución. La solución oftálmica puede estar presente como unidades inyectables individuales de jeringas pre cargadas.

La composición oftálmica de la presente invención está controlada con respecto a las partículas.

- 15 Las partículas consisten en partículas móviles no disueltas, derivadas de cualquier componente de la composición, impurezas y cualquier inestabilidad, distinta de las burbujas de gas, presentes involuntariamente en las soluciones, en donde las partículas subvisibles para inyecciones intravítreas comprenden;

- (i) 1 a 50 partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ de diámetro por mL
- 20 (ii) 0 a 5 partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ de diámetro por mL, y
- (iii) 0 a 2 partículas $\geq 50 \mu\text{m}$ de diámetro por mL

- La presencia de endotoxinas en la terapia recombinante es motivo de gran preocupación debido a las actividades biológicas diversas y potencialmente dañinas de estas moléculas. Mantener la
- 25 esterilidad en los procesos usados en la fabricación de productos biológicos, junto con protocolos estrictos para la preparación de equipos, ayuda a garantizar que los productos tengan niveles aceptablemente bajos de endotoxinas. También es evidente a partir de la literatura que en el segmento anterior y posterior del ojo, el segmento posterior (sitio de inyección intravítrea) es más sensible a la endotoxina y el tiempo de residencia de la endotoxina en este segmento se
- 30 debe mucho más a la mayor viscosidad y menor flujo de líquido en la cavidad vítrea, lo que resulta en una recuperación lenta de la respuesta celular vítrea. Incluso los niveles mínimos de endotoxinas pueden dar lugar a la inflamación intraocular dependiendo de la sensibilidad de los pacientes. Las inyecciones intravítreas de bevacizumab se administran todos los meses y

en un año se requieren de 7-8 inyecciones para la DMAE. Para evitar la acumulación de endotoxinas en el ojo por la frecuencia de inyecciones intravítreas, es obligatorio mantener los niveles de endotoxinas lo más bajo posible. El resultado de la endoftalmitis estéril y el aumento de la presión intraocular que se desarrolló después de la inyección intraocular de bevacizumab se informaron en varios casos. Aunque existen varias teorías acerca de la etiología de la inflamación intraocular, aún se desconocen sus causas. Se supone que las endotoxinas que normalmente se encuentran en los productos de las inmunoglobulinas fabricadas comercialmente juegan un papel importante en estas reacciones estériles.

Recientemente, ha habido algunos informes de endoftalmitis estéril con cultivo negativo similar a TASS después de inyecciones de IVB. Esta puede ser por endotoxina relacionada con los productos de descomposición debido a un almacenamiento defectuoso. Con el gráfico ascendente del número de inyecciones de IVB, el número de tales casos seguro que subirán, por lo tanto que requiere la necesidad de encontrar una manera juiciosa para hacer frente a tales situaciones. La etiología de la endoftalmitis estéril es poco conocida. Sin embargo, hay numerosos posibles explicaciones. Por ejemplo, la práctica común de dividir alícuotas individuales de viales de bevacizumab disponibles comercialmente, como método rentable, puede conllevar un mayor riesgo de contaminación con endotoxinas bacterianas. Las composiciones de bevacizumab en la técnica anterior y cuando se administran contienen trazas de endotoxinas a niveles que se consideran seguros para uso intravenoso, pero que aún son capaces de inducir una reacción inflamatoria intravítrea. En la endoftalmitis posterior a la inyección, la manipulación adicional del fármaco que se produce durante la preparación también juega un papel importante. Las preocupaciones con respecto al reenvasado de bevacizumab para inyección intravítrea están aumentando debido a varios brotes de endoftalmitis infecciosa informados en los Estados Unidos.

La composición oftálmica de la presente invención controla el nivel de concentración de endotoxina en el intervalo de 0.001 a 0.4 EU/mg y preferentemente en el intervalo de 0.001 a 0.2 EU/mg y con mayor preferencia en el intervalo de 0.001 a 0.16 EU/mg.

La composición oftálmica de la presente invención puede estar libre de agregados hasta la vida útil prescrita o puede tener un agregado en el intervalo de 0.1 a 5 %, más preferentemente de

0.1 a 4 % y con la máxima preferencia de 0.1 a 3.5 % durante un período de 2 a 3 años, preferentemente de 2 a 2.5 años, lo con mayor preferencia de 2 años.

La composición oftálmica de la presente invención puede mantener los límites de endotoxina bacteriana, partículas y límites agregados durante el período de vida útil, incluso si la cadena de frío se rompe de manera intermitente durante un breve período, por ejemplo, durante la transferencia. En dicho contexto, el producto de la presente invención tiene una excelente tolerancia en términos de estabilidad y eficacia.

La composición oftálmica de la presente invención no tiene variación de dosis entre las unidades ya que pueden pre llenarse a la dosis determinada mediante automatización. Además, la dosis en una unidad individual permanece sin cambios hasta la vida útil prescrita.

La composición oftálmica de Bevacizumab de la presente invención, comprende:

- a. Prueba de endotoxinas bacterianas (BET) en el intervalo de 0.001 a 0.4 EU/mg y preferentemente en el intervalo de 0.001 a 0.2 EU/mg y con mayor preferencia en el intervalo de 0.001 a 0.16 EU/mg;
- b. en donde las partículas son;
 - i. 1 a 50 partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ de diámetro por mL,
 - ii. 0 a 5 partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ de diámetro por mL, y,
 - iii. 0 a 2 partículas $\geq 50 \mu\text{m}$ de diámetro por mL; y;
- c. en donde la composición tiene un agregado de 0.1 a 5 %, con mayor preferencia de 0.1 a 4 % y con la máxima preferencia de 0.1 a 3.5 % durante un período de 2 a 3 años, preferentemente de 2 a 2.5 años, con la máxima preferencia de 2 años.

En otra modalidad, se proporcionó un proceso de preparación de la composición controlado con respecto al número de partículas subvisibles, bajos niveles de endotoxinas y está sustancialmente o completamente desprovisto de aceite de silicona durante la vida útil del producto de la presente invención que comprende las etapas de:

- i. cultivar las células de bevacizumab por el método de fermentación continua en células CHO;

- ii. someter la cosecha libre de células obtenida del cultivo de células CHO a una filtración profunda basada en adsorción para una clarificación adicional;
- iii. concentrar la muestra de la etapa (ii) mediante el uso de filtración de flujo tangencial de un solo paso para obtener la cosecha concentrada;
- 5 iv. someter la cosecha concentrada de la etapa (iii) a cromatografía de proteína A para capturar el bevacizumab y obtener un eluato que contiene bevacizumab parcialmente purificado;
- v. someter el eluato de la etapa (iv) a inactivación de virus a pH bajo para obtener la muestra con inactivación viral;
- 10 vi. someter la muestra con inactivación viral de la etapa (v) a una cromatografía de intercambio catiónico adicional para una purificación adicional para obtener un eluato que contiene principalmente bevacizumab altamente purificado;
- vii. someter el eluato de la etapa (vi) a cromatografía de intercambio aniónico para eliminar las trazas de impurezas, por ejemplo, proteínas de células huésped (HCP), ADN de células huésped (HCD), endotoxinas;
- 15 viii. someter el eluato de la etapa (vii) a filtración de reducción de virus para eliminar los virus presentes;
- ix. concentrar y diafiltrar la muestra de la etapa (viii) para obtener el bevacizumab; y;
- x. formulación de la muestra obtenida de la etapa (ix) para lograr la composición de bevacizumab de la presente invención.
- 20

La baja inactivación del virus puede llevarse a cabo a un pH en el intervalo de pH 3.0 a 5.0 preferentemente en el intervalo de 3.0 a 4.0, con la máxima preferencia en el intervalo de pH 3.5 a 4.0.

25

La cromatografía de intercambio catiónico del eluato se puede realizar mediante el uso de una matriz o una fase estacionaria seleccionada del grupo que comprende SO_3^- sulfoisobutilo, SO_3^- sulfoetilo, sulfopropilo, carboximetilo, etc., preferentemente la matriz de cromatografía o fase estacionaria usada es sulfonato.

30

La cromatografía de intercambio aniónico del eluato se puede realizar mediante el uso de una matriz o una fase estacionaria seleccionada del grupo que comprende dietilaminoetilo, amina

cuaternaria, policuaternio, N-bencil-N-metil etanol amina, etc., preferentemente la matriz de cromatografía o la fase estacionaria usada es amina cuaternaria.

La diafiltración se puede realizar en presencia de tampón de diafiltración TFF-II.

5

El proceso como se describe en la presente descripción da como resultado un producto y una composición con el efecto de endotoxina deseado. Por ejemplo, el nivel de endotoxinas puede reducirse secuencialmente como se indica más abajo: (Ver la Tabla A)

10 **Tabla A: Representación del nivel de endotoxina en base al proceso de la presente invención.**

Etapas del proceso	Niveles de endotoxinas después de cada etapa
Filtración de flujo tangencial de un solo paso (SPTFF)	NMT 10 UE/mg
Cromatografía de proteína A	NMT 10 UE/mg
Cromatografía de intercambio catiónico	NMT 5 UE/mg
Cromatografía de intercambio aniónico	Menos de 0.5 UE/mg
Al final del proceso	Menos de 0.16 UE/mg

De la Tabla A anterior, el proceso de la presente invención da como resultado una disminución de varias veces en el contenido de endotoxina según lo determinado por el método Gel Clot.

15 Antes de someter el caldo cosechado al proceso de purificación, el contenido de endotoxinas es muy alto. Después de la purificación por afinidad con la Proteína A, el contenido de endotoxinas no es superior a 10 UE/mg, que suele ser muy superior al nivel aceptable. Además, se ha usado la cromatografía de intercambio aniónico para separar y eliminar la endotoxina del activo bevacizumab.

20

Al final de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, el contenido de endotoxinas en la proteína es inferior a 0.5 UE/mg. El uso de la cromatografía de intercambio aniónico en el proceso de la presente invención permite controlar los atributos de calidad críticos del producto farmacéutico, por ejemplo, BET, biocarga, agregados y PMT en un intervalo más estrecho.

La eliminación de endotoxinas es uno de las etapas más difíciles en el proceso de purificación aguas abajo. Para permitir el logro de los límites de endotoxinas del bevacizumab de la presente invención, para obtener una composición oftálmica que tenga una concentración de endotoxinas de menos de 0.4 UE/mg y preferentemente menos de 0.2 UE/mg y con mayor preferencia menos de 0.16 UE/mg. Además, el proceso debe implicar:

- (i) Uso de soluciones y equipos estériles para minimizar la introducción de microorganismos,
- 10 (ii) Mediante el uso de filtración durante la purificación con filtros de 0.22 micras,
- (iii) Trabajando a baja temperatura para minimizar el crecimiento microbiano,
- (iv) Adición de agentes bacteriostáticos a la purificación,
- (v) Materias primas de alta calidad,
- (vi) Etapas de purificación ortogonales,
- 15 (vii) Procedimientos rigurosos de limpieza in situ (CIP) para recipientes, columnas y equipos de proceso.

El proceso de la presente invención como se describe en la presente descripción es nuevo y da como resultado un producto con los parámetros deseados. El proceso debe seguirse en la secuencia que se establece en la presente descripción para lograr el producto con las propiedades deseadas. Este proceso se desarrolla después de mucha experimentación, ensayo y error.

- El proceso de la presente invención proporciona una composición oftálmica de Bevacizumab;
- 25 a. en donde los límites del ensayo de endotoxina bacteriana (BET) están en el intervalo de 0.001 a 0.4 EU/mg y preferentemente en el intervalo de 0.001 a 0.2 EU/mg y con mayor preferencia en el intervalo de 0.001 a 0.16 EU/mg;
 - b. en donde las partículas son;
 - i. 1 a 50 partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ de diámetro por mL,
 - 30 ii. 0 a 5 partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ de diámetro por mL, y,
 - iii. 0 a 2 partículas $\geq 50 \mu\text{m}$ de diámetro por mL; y;

- c. en donde la composición tiene un agregado de 0.1 a 5 %, más preferentemente de 0.1 a 4 % y con la máxima preferencia de 0.1 a 3.5 % durante un período de 2 a 3 años, preferentemente de 2 a 2.5 años, con mayor preferencia de 2 años.

- 5 En otra modalidad, la presente invención describe una composición oftálmica que comprende bevacizumab, un tampón, un estabilizador y un tensioactivo.

La concentración de bevacizumab en la composición puede estar en el intervalo de 24 mg/mL a 26 mg/mL, preferentemente en el intervalo de 25 mg/mL a 26 mg/mL, con mayor preferencia
10 25 mg/mL.

El tampón presente en la composición se puede seleccionar del grupo que comprende fosfato, citrato, acetato, histidina, succinato, gluconato, glicina y similares, con mayor preferencia tampón fosfato. La concentración de tampón puede estar preferentemente en el intervalo de 40
15 mM a 60 mM, con mayor preferencia en el intervalo de 50 mM a 60 mM. El pH del tampón puede estar preferentemente en el intervalo de 6.0 a 7.0, con mayor preferencia de 6.1 a 6.3.

El estabilizador puede ser un sacárido. El sacárido puede ser un monosacárido, disacárido, trisacárido, polisacárido, alcohol de azúcar, azúcar reductor, azúcar no reductor, etc. Ejemplos
20 de sacárido en la presente descripción incluyen glucosa, sacarosa, trehalosa, lactosa, fructosa, maltosa, dextrano, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, silitol, sorbitol, manitol, melibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa, estaquiosa, maltosa, lactulosa, maltulosa, glucitol, maltitol, lactitol, iso-maltulosa y similares. El sacárido preferido puede ser un disacárido no reductor, como la trehalosa.

25 La cantidad de sacárido en la composición puede estar en el intervalo de 40 mg/mL a 70 mg/mL, preferentemente el intervalo puede ser de 45 mg/mL a 65 mg/mL, con mayor preferencia el intervalo es de 50 mg/mL a 60 mg/mL.

30 El tensioactivo presente en la composición se refiere a un agente tensioactivo, preferentemente un tensioactivo no iónico. Los ejemplos de tensioactivos en la presente descripción incluyen polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80). El tensioactivo preferido aquí es el polisorbato 20.

La cantidad de tensioactivo en la composición puede estar en el intervalo de 0.2 mg/mL a 0.6 mg/mL, preferentemente en el intervalo de 0.3 mg/mL a 0.5 mg/mL, con mayor preferencia en el intervalo de 0.35 mg/mL a 0.45 mg/mL.

5

La composición de la presente invención es una solución homogénea y estable durante la vida útil del producto y por lo tanto es una composición sinérgica.

10 En otra realización más, la composición oftálmica de la presente invención se puede administrar como una dosis predeterminada en forma de vial, cartucho o pluma o jeringa pre cargada, preferentemente una jeringa pre cargada, preferentemente una jeringa pre cargada de un solo uso, con un volumen de llenado de 140 microL a 200 microL y con una dosis de 50 microL. La composición está sustancialmente o completamente desprovista de aceite de silicona.

15

El cuerpo de la jeringa puede estar compuesto por un material seleccionado del grupo que comprende un polímero o vidrio, o marcas codificadas recubiertas en cualquier superficie; un material termoplástico; una poliolefina, tal como un polímero de olefina cíclica, un copolímero de olefina cíclica o polipropileno; un poliéster, tal como tereftalato de polietileno; un 20 policarbonato; o cualquier combinación o copolímero de los mismos.

El tapón del émbolo de la jeringa pre cargada puede estar compuesto por cualquier material adecuado seleccionado del grupo que comprende cauchos de clorobutilo, bromobutilo u otros halo alquilo. El émbolo puede recubrirse opcionalmente con materiales seleccionados del 25 grupo que comprende silicio, fluoropolímeros, parileno y similares. Dicho recubrimiento puede usarse para minimizar cualquier interacción y/o fricción que pueda producirse entre diferentes partes del dispositivo o entre el dispositivo y el fármaco durante el almacenamiento o el envío. La punta del tapón del émbolo puede tener forma plana o convexa. Los anillos del émbolo pueden estar presentes para un sellado hermético del émbolo y la pared del cilindro. El tapón 30 puede estar siliconado o recubierto con bromo, cloro, flúor o polímeros relacionados.

La jeringa puede estar opcionalmente recubierta. Una capa o recubrimiento interno, seleccionado del grupo que comprende un recubrimiento de unión, un recubrimiento de barrera,

un recubrimiento protector de pH o un recubrimiento de lubricidad, preferentemente un recubrimiento de lubricidad con el lubricante seleccionado del grupo que consiste en aceite de silicona, fluoropolímero, parileno y compuestos relacionados, en el intervalo de 0.1 mg – 0.4 mg de aceite de silicona. Los cilindros de las jeringas de vidrio de borosilicato bajo en silicona se pueden recubrir por aspersión con una emulsión de aceite en agua de silicona y, subsecuentemente, se pueden fijar con calor (es decir, "silicona horneada") o reticular. Dicho recubrimiento y/o estratificación se puede usar para minimizar cualquier interacción y/o fricción que pueda producirse entre diferentes partes del dispositivo o entre el dispositivo y el fármaco durante el almacenamiento o durante el envío. Preferentemente, la jeringa precargada puede estar completamente libre o desprovista de aceite de silicona.

La forma de dosificación predeterminada de la presente invención, como una jeringa precargada, puede rellenarse con un gas inerte seleccionado del grupo que comprende nitrógeno, argón, helio, preferentemente nitrógeno. La jeringa farmacéutica precargada puede tener un máximo nominal con un volumen de llenado de 140 microL a 200 microL y con una dosis de 50 microL.

La composición de la presente invención se puede administrar como una jeringa precargada. La composición de la presente invención se puede llenar en una jeringa precargada para inyección intravítrea. Para disminuir la posibilidad de que se inyecten gotitas de aceite de silicona en el ojo, la jeringa precargada de la presente invención puede comprender un cilindro que está sustancialmente o completamente libre de aceite de silicona. La jeringa precargada puede comprender un recubrimiento interno de aceite de silicona, dicho recubrimiento interno puede tener 0.1 mg - 0.4 mg de aceite de silicona. Como alternativa, la jeringa precargada puede estar revestida en el interior con una capa o recubrimiento de unión, una capa o recubrimiento de barrera, una capa o recubrimiento protector del pH y, opcionalmente, una capa de lubricidad, preferentemente la capa puede ser de fluoropolímero, parileno y compuestos relacionados. En una modalidad, la jeringa precargada puede estar completamente libre de aceite de silicona. Los cilindros de las jeringas de vidrio de borosilicato bajo en silicona se pueden recubrir por aspersión con una emulsión de aceite en agua de silicona y, subsecuentemente, se pueden fijar con calor (es decir, "silicona horneada") o reticular. Dicho recubrimiento y/o estratificación se puede usar para minimizar la interacción y/o la fricción

que se puede producir entre diferentes partes del dispositivo o entre el dispositivo y el fármaco durante el almacenamiento o el envío.

En la presente invención, la interacción entre el contenido y el recipiente se minimiza y es fundamental para mantener la eficacia, especialmente para retener la estabilidad para el almacenamiento/uso a largo plazo durante todo el período de vida útil de 2 años. El Solicitante realizó varios estudios y se esforzó de manera que este problema del estado de la técnica se aborde por completo con respecto a esto.

En otra modalidad más, la composición oftálmica de la presente invención puede usarse para tratar trastornos oculares. El trastorno ocular puede seleccionarse del grupo que comprende la degeneración macular húmeda relacionada con la edad, la neovascularización coroidea, la proliferación angiomasiosa retiniana, la miopía patológica, las estrías angioides, la enfermedad de Best, la distrofia viteliforme del adulto, la coriorretinopatía serosa central, la coriodopatía interna punteada, la coroiditis multifocal, la presunta enfermedad ocular, síndrome de histoplasmosis, osteoma corioideo, toxoplasmosis, uveítis, pseudotumor cerebral, neovascularización retinal idiopática peripapilar, retinopatía diabética proliferativa, retinopatía de células falciformes, retinopatía del prematuro, enfermedad de Eales, edema macular, retinopatía diabética, oclusión de la vena central de la retina, oclusión de la rama de la vena retiniana, vasculitis oclusiva, uveítica, pseudofáquica, retinitis pigmentosa, glaucoma neovascular, oclusión de la vena central de la retina, oclusión de la rama de la vena retiniana, retinopatía diabética proliferativa, oclusión de la arteria central de la retina, síndrome isquémico ocular, radiación inducida, neuropatía óptica por radiación, radiación retinopatía, cáncer de mama con metástasis corioidea, neovascularización asociada a melanoma, macroaneurisma, tumor vasoproliferativo, enfermedad de Coats, hemangioma capilar yuxtapapilar, telangiectasia macular idiopática, vasculopatía corioidea polipoidea, coriorretinopatía serosa central, neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica, neovascularización corneal herpética, neovascularización corneal penfigoide cicatricial, Neovascularización capsular posterior, neovascularización por rechazo de injerto corneal, neovascularización corneal asociada a ojo seco, revisión de ampolla, complementario a la cirugía de filtración de glaucoma, preferentemente degeneración macular húmeda relacionada con la edad.

En otra modalidad más, la presente invención proporciona un kit que comprende la composición oftálmica de la presente invención en un formato administrable, como una jeringa precargada, un vial o un cartucho, preferentemente una jeringa precargada. El kit puede comprender una jeringa precargada, envasada en un empaque tipo burbuja, que a su vez puede ser estéril por dentro. En una modalidad, las jeringas de acuerdo con la invención pueden colocarse dentro de dichos empaque tipo burbuja antes de someterse a la esterilización, por ejemplo, la esterilización terminal. El empaque tipo burbuja puede estar formado por un material termoplástico adecuado tal como vidrio, poliolefina, un polímero de olefina cíclica o un copolímero de olefina cíclica, polipropileno o un poliéster o cualquier combinación o copolímero de los mismos. El kit también puede comprender una aguja para la administración de la composición oftálmica de la presente invención.

La aguja puede ser cualquier aguja de calibre 29 a 33 $\times \frac{1}{2}$ pulgada, aunque agujas de calibre 31 y calibre 32, calibre 33 o calibre 34 podrían usarse alternativamente. El kit también puede contener un prospecto del producto, que incluye instrucciones para su uso.

La presente invención divulga un kit que comprende la composición oftálmica en una jeringa precargada, que comprende una jeringa precargada, una aguja con calibre en el intervalo de calibre 29 a 34, instrucciones para su uso en un empaque tipo burbuja.

La composición es estable a una temperatura de 2-10 °C, preferentemente de 2 a 8 °C al menos durante 2 años. La composición oftálmica de la presente invención es estable durante al menos dos años y no solo mantiene la facilidad de uso seguro pero también tienen bajo nivel de partículas subvisibles, BET y agregados durante su vida útil de dos años.

VENTAJAS:

La composición oftálmica de la presente invención tiene las siguientes ventajas, pero las ventajas no pueden limitarse a las que se enumeran en la presente descripción más abajo:

- El producto es muy estable en comparación con otras jeringas anteriores compuestas a partir del vial.
- Comprende un BET dentro del límite establecido en la presente descripción.
- Contiene una dosis predeterminada, de esta manera reduce los errores de dosificación y asegura la eliminación de la forma de dosificación después de una sola administración,

evitando el uso múltiple y, por lo tanto, evitando el uso múltiple y las infecciones derivadas del uso múltiple.

- Tiene potencialmente menos efectos previos a la inyección y posteriores a la inyección.
- Tiene una vida útil de 2 años en comparación con la vida útil variada de 14 días a un máximo de 6 meses (en la India 14 días, la FDA propone que se limite solo a 5 días después del reenvasado) de los productos del estado de la técnica.
- La composición de la presente invención que tiene no más de 50 partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ de diámetro por mL, no más de 5 partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ de diámetro por mL y no más de 2 partículas $\geq 50 \mu\text{m}$ de diámetro por mL.
- El bevacizumab de grado oftálmico contenido en la jeringa precargada de la presente invención es estable a una temperatura de 2 a 8 °C durante la vida útil prescrita.
- La composición de la presente invención se somete a todos los controles de calidad prescritos en el momento de la liberación, a diferencia de las composiciones reenvasadas o compuestas del estado de la técnica.
- Minimiza las visitas al hospital, reduce el desperdicio de medicamentos, minimiza los desechos hospitalarios e industriales y elimina el riesgo de contaminación microbiana.

La presente invención se ilustra por medio de ejemplos. Los ejemplos tienen fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes.

EJEMPLOS:

Ejemplo 1: Proceso de purificación de bevacizumab

La cosecha libre de células que contiene el anticuerpo monoclonal de bevacizumab obtenido de biorreactores basados en tecnología de perfusión de células CHO. La cosecha se filtró con un filtro de 0.2 μm y se sometió a una filtración profunda basada en adsorción para la clarificación de la cosecha. La cosecha filtrada se concentró para lograr una concentración de Bevacizumab mediante el uso de un módulo TFF de un solo paso. La 'cosecha concentrada' obtenida de la etapa TFF-I se filtró mediante el uso de un filtro de 0.2 μm y se sometió a una columna de cromatografía Affinity rellena con resina Mab Select Sure LX (GE Healthcare). La columna se equilibró con el tampón de equilibrio-1 (EB-1, tampón de fosfato: 20 mM, NaCl: 150 mM, pH 7.1 $\pm$ 0.2) pasando 5 volúmenes de columna (CV) de EB-1 a tasa de flujo de 150 cm/h. La muestra se cargó en la columna con una tasa de flujo lineal de 150 cm/h seguido del pase de EB-1 de 5 CV a una tasa de flujo de aproximadamente 150 cm/h. Esto fue seguido por

5 CV del tampón de lavado-1 (WB-1, Acetato de sodio: 40 mM, pH 6.0) a una tasa de flujo de 150 cm/h. La proteína diana unida se eluyó pasando aproximadamente 5 CV de tampón de elución-1, (EUB-1, Acetato de sodio: 30 mM, pH 3.5) y recolectados en base a la absorbancia a 280 nm. El eluato (E-1) se analizó en cuanto a cantidad de proteínas, glicanos, HCP, variantes de carga, agregados y contenido de endotoxinas. En esta etapa, el contenido de endotoxinas de E-1 no supera (NMT) 10 EU/mg y el contenido agregado es NMT 5 %. En la siguiente etapa, E-1 se somete a un paso de inactivación a pH bajo donde E-1 se incubaba a temperatura ambiente con agitación suave continua durante 60 minutos a pH 3.7. Después de la inactivación viral, la solución se diluye con tampón de equilibrio CEX-2 (EB-2, acetato de sodio: 50 mM, NaCl: 80 mM, pH 5.3) seguido de filtración mediante el uso de un filtro de 0.2 µm. En la siguiente etapa, la columna de intercambio catiónico (Capto S ImpAct, GE Healthcare) se equilibró con 5 CV de tampón de equilibrio-3 (EB-3, acetato de sodio: 50 mM, NaCl: 80 mM, pH 5.3) a una tasa de flujo de 250 cm/h. La muestra se cargó en la columna a una tasa de flujo de 250 cm/h seguida de 3 CV del tampón de lavado-2 (WB-2, acetato de sodio: 50 mM, NaCl: 80 mM, pH 5.3) a la tasa de flujo de 250 cm/h. La muestra se pasó por un gradiente lineal de 0-15 % B en 1.5 CV seguido de 15-25 % B en 20 CV mediante el uso de EB-3 y tampón de elución-2 (EUB-2, acetato de sodio: 50 mM, NaCl: 500 mM, pH 5.3) a una tasa de flujo de 250 cm/h y las fracciones se recolectaron en base a UV 280. El eluato (E-2) se analizó en cuanto a cantidad de proteína, variantes de carga, agregados y contenido de endotoxinas. Después de esta etapa, el contenido de endotoxinas de E-2 es NMT 5 UE/mg.

En la siguiente etapa, las fracciones de elución CEX en base a los resultados analíticos de la variante de carga en E-2 se agruparon y diluyeron mediante el uso del tampón de equilibrio AEX (EB-4, Tris: 20 mM, pH 8.0) seguido de filtración mediante el uso de un filtro de 0.2 µm. En la siguiente etapa, la columna de intercambio aniónico (Capto Q, GE Healthcare) se equilibró con 10 CV de tampón de equilibrio-4 (EB-4, Tris: 20 mM, pH 8.0) a una tasa de flujo de 250 cm/h. La muestra se cargó en la columna a una tasa de flujo de 250 cm/h seguido de 2 CV del tampón de lavado 3 (WB-3, EB-4, Tris: 20 mM, pH 8.0) a una tasa de flujo de 250 cm/h. La columna se regeneró con 5 CV de tampón de regeneración (Tris: 20 mM, NaCl: 1 M, pH 8.0) y se colectó el flujo continuo (FT) para su posterior análisis denominado "AEX FT". Se analizó la cantidad de proteínas, glicanos, HCP, variantes de carga, agregados y contenido de endotoxinas. En esta etapa, el contenido de endotoxinas no supera (NMT) 0.5 UE/mg y el contenido agregado no supera el 3 %. Además, se filtró "AEX FT" mediante el uso de un

prefiltro y nanofiltro conectados en serie, a una presión diferencial de 1.5 ± 0.5 Bar y el nanofiltrado se concentró y diafiltró con tampón de diafiltración (PB: 51mM, Trehalosa dihidrato: 20 mg/mL, pH 6.0 ± 0.2). La muestra diafiltrada se enriqueció con trehalosa dihidratada para fabricar la concentración final hasta 60 mg/mL y con polisorbato 20 al 5 % para completar la concentración final hasta un 0.04 % y se diluye aún más para alcanzar la concentración de bevacizumab especificada para producir la sustancia activa (DS) de bevacizumab. El DS se sometió a una caracterización analítica integral que incluye, entre otros, cantidad de proteínas, glicanos, HCP, variantes de carga, agregados, contenido de endotoxinas, partículas y ensayos de unión a receptores *in vitro* e *in vivo*. En DS, el contenido de endotoxinas es inferior a 0.16 UE/mg, el contenido de agregados es 0.8 % y los límites de partículas subvisibles que se indican más abajo, se encuentran dentro de los límites especificados por la presente invención.

- (i) $\geq 10 \mu\text{m}$ partículas no es más de 50 partículas/mL.
- (ii) $\geq 25 \mu\text{m}$ partículas no es más de 5 partículas/mL.
- (iii) $\geq 50 \mu\text{m}$ de partículas no es más de 2 partículas/mL.

La capacidad para alcanzar los límites de la presente invención con respecto a la endotoxina, la reducción de agregados y la reducción de HCP se proporciona más abajo en la Tabla 1.

Tabla 1: Efectividad del proceso de la presente invención

Etapas del proceso	Nivel de endotoxinas después de cada etapa	Nivel de agregados después de cada etapa	Nivel de HCP después de cada etapa
SPTFF	NMT 10 UE/mg	NA	NA
Cromatografía de Proteína A	NMT 10 UE/mg	NMT 5 %	NMT 5000 ppm
Cromatografía de intercambio catiónico	NMT 5 UE/mg	NMT 5 %	NMT 200 ppm
Cromatografía de intercambio aniónico	Menos de 0.5 UE/mg	Menos del 3 %	NMT 100 ppm
Bevacizumab DS	Menos de 0.16 UE/mg	0.8 %	1 ppm

Ejemplo 2: Composición de acuerdo con la presente invención

El bevacizumab tal como se obtiene en el ejemplo 1. La composición de la presente invención se puede formular mediante el uso de los diversos ingredientes que se describen a más abajo en la Tabla 2.

5 **Tabla 2: Composición oftálmica ilustrativa de la presente invención**

	C1	C2	C3
Bevacizumab	Bevacizumab	Bevacizumab	Bevacizumab
Azúcar	Sacarosa	Trehalosa	Trehalosa
Tampón	Tampón de acetato	Tampón de histidina	Tampón fosfato
Tensioactivo	Polisorbato 20	Polisorbato 20	Polisorbato 20

Se procesó la Composición 3 (C3) para experimentación adicional como se indica más abajo. Algunos ejemplos ilustrativos se encuentran en la Tabla 3.

10 **Tabla 3: Composición oftálmica de la presente invención**

	C31	C32	C33
Bevacizumab	25 mg/mL	25 mg/mL	25 mg/mL
Trehalosa	50 mg/mL	70 mg/mL	60 mg/mL
Tampón fosfato	55 mM	45 mM	51 mM
Polisorbato	0.02 %	0.03 %	0.04 %
pH	6.2	6.2	6.2

La composición C33 de la presente invención se analizó más abajo y los resultados se presentan en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 3: Caracterización analítica de la composición de la presente invención en jeringa precargada

15 Se usó una jeringa precargada de un solo uso para llenar la composición oftálmica de bevacizumab, que se presenta en forma de solución. Tres lotes de bevacizumab en PFS se caracterizaron ampliamente para determinar las propiedades fisicoquímicas, la actividad biológica, las propiedades inmunoquímicas, la pureza y las impurezas mediante técnicas apropiadas. Las características del producto cumplen con los criterios de aceptación como se
20 muestra en la Tabla 4 más abajo:

Tabla 4: Caracterización analítica de bevacizumab en PFS

Núm.	Ensayo	Criterios de Aceptación de DP	Media de 3 lotes	SD
1.	pH	6.0-6.4	6.13	0.06
2.	Concentración de proteína (mg/mL)	25 ± 0.5 mg/mL	25.17	0.12
3.	Mapa de péptidos	El perfil del mapa de péptidos de la solución de muestra es cualitativamente similar a la solución estándar de referencia	Conforme	-
4.	Agregación (%)	NMT 2 %	0.85	0.24
5.	Contenido de glicanos (%)	Suma de todos los oligosacáridos sin galactosa: NLT 70.0 %	84.13	2.64
6.	Variantes de carga (%)	NMT ácido 45 % NMT básico 5 %	14.43 0.83	2.26 0.12
7.	pI	El pI del pico principal obtenido de la solución muestra difiere en NMT ± 0.2 unidades de pI del pI del pico correspondiente obtenido de la Solución estándar	Conforme	-
8.	Impurezas de bajo peso molecular (%)	NMT 5 %	2.03	0.32
9.	Impureza de cadena pesada no glicosilada (%)	NMT 2.0 %	0.77	0.12
10.	Potencia de unión (%)	80 %–120 % de la potencia indicada	103.83	6.85
11.	Potencia de neutralización (%)	NLT 80.0 % y NMT 120.0 % de la potencia indicada	103.67	6.11
12.	Partículas subvisibles ≥10 µm	No más de 50/mL	22	7.64
13.	Partículas subvisibles ≥25 µm	No más de 5/mL	1	0

Ejemplo 4: Estudio de estabilidad de la composición de la presente invención en PFS de un solo uso

5 Bevacizumab (grado oftálmico) en PFS de un solo uso se sometió a un estudio de estabilidad a largo plazo a 5 °C ± 3 °C durante 24 meses. Los PFS se rellenaron con 25 mg/mL de bevacizumab, tampón fosfato, polisorbato 20 y trehalosa dihidratada, pH 6.2. Durante el

programa de estabilidad completa, no se detectaron cambios significativos en la concentración de proteína y el pH. Datos de estudios de estabilidad de 24 meses del producto farmacéutico ampliamente analizados en cuanto a propiedades fisicoquímicas, actividad biológica, propiedades inmunoquímicas, pureza e impurezas y que muestran que el producto es estable a 5 °C ± 3 °C durante 24 meses (Tabla 5).

Tabla 5: Estudio de estabilidad a largo plazo de bevacizumab grado oftálmico a 5 °C ± 3 °C durante 24 meses

Ensayo	Especificación de fin de vida útil	Inicio	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	24 meses
Apariencia	Líquido claro incoloro a marrón pálido, libre de partículas visibles	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme
pH	6.0-6.4	6.10	6.23	6.03	6.11	6.18	6.35
Conc. de proteínas (mg/mL)	25.5 ± 0.5 mg/mL	25.10	25.07	25.23	25.15	25.20	25.37
SDS PAGE	Las bandas principales deben observarse a 150 kD en condiciones no reducidas; a 50 kD y 25 kD en condiciones reducidas	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme
% Eficiencia de unión (ELISA)	80 %–125 % de la potencia indicada	100.6	95.9	99.7	111.8	112.5	100.7
Potencia de neutralización de VEGF	NLT 80.0 % y NMT 125.0 % de la potencia indicada	108.1	105.4	104.1	97.3	108.7	93.6
% impureza de NGHC	NMT 2.0 %	0.70	0.73	0.78	0.70	0.70	0.61
% Agregación	NMT 3.0 %	0.81	1.32	1.47	1.93	2.01	2.64
% Oligosacáridos sin galactosa	Suma de todos los oligosacáridos sin galactosa: NLT 70.0 %	85.90	85.49	80.08	85.87	83.32	83.81
Partículas ≥10µ	No más de 50/mL	46	44	23	16	11	8

Partículas ≥25μ	No más de 5/mL	1	1	1	1	1	1
--------------------	----------------	---	---	---	---	---	---

Las características del producto cumplen con los criterios de aceptación durante toda la duración mostrando que el producto es estable a 5 °C ± 3 °C durante 24 meses.

En el estado de la técnica, bevacizumab reenvasado del vial (Avastin®) en jeringas no es estable durante más tiempo. Existen reportes en los que se ha analizado la calidad del bevacizumab compuesto reenvasado en jeringas plásticas (Polipropileno y policarbonato) para inyección intravítrea hasta 3 o 6 meses. En estos estudios, se informaron cambios en el contenido de inmunoglobulina G (IgG), presencia de microgotas de aceite de silicona, aumento de partículas subvisibles y agregación de proteínas. También se observó que el bevacizumab reenvasado de diferentes proveedores mostraba una calidad del producto variable. En una de los estados de la técnica, se observó una degradación del 15.9 % de la actividad anti-VEGF en un período de tiempo de estabilidad de 6 meses del bevacizumab compuesto.

Debido a problemas relacionados con la estabilidad, borrador de la guía de la USFDA que propone limitar la caducidad de Avastin pre-cargado® PFS a 5 días. En India, el Controlador General de Drogas de India (DCGI) redactó una guía para el procedimiento de preparación magistral y se mencionó que el uso de estas jeringas no debe hacerse más allá de los 14 días. Por lo tanto, la estabilidad de bevacizumab durante un período prolongado con las cualidades deseadas en jeringas reenvasadas es un problema crítico y responsable de la inflamación ocular. La invención actual supera estas limitaciones y proporciona un almacenamiento prolongado de bevacizumab al cumplir todos los criterios de aceptación establecidos en la presente descripción durante la vida útil.

En comparación con el estado de la técnica, la composición de la presente invención posee un tamaño de partícula de >10μm y >25μm durante toda la vida útil de 2 años. La composición oftálmica de la presente invención es estable a una temperatura de 2 a 8 °C durante al menos dos años y es segura, no tóxica y eficaz para la administración durante la vida útil.

Ejemplo 5: Estudio de toxicidad de la composición de la presente invención

Jeringas precargadas de un solo uso rellenas con bevacizumab de grado oftálmico analizadas para un estudio de toxicidad intravítrea de dosis repetidas (4 semanas) con un período de

recuperación de 4 semanas en ojos de conejo. El estudio se realizó en instalaciones GLP para evaluar la toxicidad de bevacizumab en los ojos. Los PFS se rellenaron con 25 mg/mL de bevacizumab, 51 mM de PB, polisorbato 20 al 0.04 % y 60 mg/mL de dihidrato de trehalosa, pH 6.2. El producto cumplió con todos los parámetros de composición oftálmica durante la vida útil.

Durante su uso terapéutico en enfermedades oculares, Bevacizumab se inyecta directamente en el humor vítreo, que comprende un compartimento especial del ojo. El producto de ensayo Bevacizumab, o la muestra de referencia del vehículo (diluyente), se administraron mediante inyecciones intravítreas en ambos ojos de cada conejo, una vez cada dos semanas durante cuatro semanas, es decir, los días 1, 15 y 29, durante el período del estudio.

Se observó la incidencia de mortalidad y signos de toxicidad local y sistémica en los conejos durante el estudio y luego se sacrificaron y se sometieron a una necropsia completa.

Grupos de recuperación simultáneos adicionales de tres conejos de cada sexo en el control de vehículo y el nivel de dosis alta se trataron de manera similar pero, después de la interrupción del período de tratamiento, se observó más la reversión de la toxicidad/toxicidad retardada, si la hubo, durante un período de 28 días.

El estudio proporcionó información sobre los órganos diana, las posibilidades de acumulación, la reversibilidad de los efectos tóxicos, una estimación de un nivel de exposición sin efecto, que se usó para establecer criterios de seguridad para la exposición humana. En los estudios de toxicidad se seleccionaron tres niveles de dosis. El nivel de dosis usado en el estudio fue un múltiplo de la dosis equivalente humana (HED) de bevacizumab para conejos, es decir, 1.25 mg, 2.50 mg o 3.75 mg por ojo, que son respectivamente 1X, 2X y 3X de la dosis humana terapéutica absoluta y se inyectó en un volumen de 50 µL.

En base a los resultados del estudio, se concluyó que el producto no indujo ningún efecto sistémico, adverso o de cualquier otra manera, en conejos tratados con una dosis de hasta 3.75 mg por ojo. El bevacizumab de grado oftálmico fue bien tolerado en los ojos de los conejos luego de sus inyecciones intravítreas a niveles de dosis de 1.25 mg, 2.50 mg o 3.75 mg por ojo; y se encontró que el nivel sin efectos adversos observados (NOAEL) de la composición

oftálmica de la presente invención en conejos era superior a 3.75 mg por ojo. Por lo tanto, en estudios preclínicos intravítreos se encuentra que el fármaco es seguro para la vía intravítrea.

Específicamente, la invención proporciona composiciones farmacéuticas con niveles de endotoxinas y niveles de partículas significativamente reducidos que son adecuados para el uso intravítreo. La invención también se refiere a métodos para reducir el nivel de PMT y endotoxinas dentro de ciertas composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que pueden usarse para administración intraocular.

Ejemplo 6: Comparación de la composición de la presente invención con la composición del estado de la técnica

La composición de la presente invención preparada como se expone en los ejemplos anteriores se comparó con composiciones actuales disponibles en el mercado y que se están administrando a los pacientes.

A. Comparación de partículas subvisibles:

Las partículas subvisibles se analizaron según el método USP 789 mediante el recuento de partículas de oscurecimiento de la luz (LOPC). Para el ensayo se usaron botellas de vidrio libres de partículas de volumen apropiado. Se extrajeron muestras de 10 PFS que hacen un volumen de alrededor de 1 mL en una botella de vidrio. Además, la muestra se diluyó con agua libre de partículas para obtener un volumen final de 25 mL. El contenido de la muestra se mezcló lentamente invirtiendo el recipiente 20 veces sucesivamente sin introducir burbujas de aire mientras se agrupaban los recipientes totales en un recipiente libre de partículas. Los recipientes de muestra se dejaron reposar durante al menos 15 minutos antes del análisis para eliminar las burbujas de aire. Se retiraron cuatro porciones de no menos de 5 mL cada una y se contó el número de partículas iguales y mayores a 10 μm , 25 μm y 50 μm . Los resultados se presentan después de descartar el resultado obtenido en la primera porción.

The sub-visible particulate matter of repackaged bevacizumab from five UK compounding pharmacies (S1–S5) and compared with the ophthalmic composition of the present invention. (Eye (2013) 27,1090-1097). Los resultados se presentan como figuras 2a y 2b. A partir de las figuras 2a y 2b, puede verse claramente que el tamaño de partícula de la presente invención

está dentro del intervalo establecido en la presente invención, de esta manera el potencial de incidencia de inflamación ocular es muy bajo.

B. Comparación de la estabilidad al almacenamiento de la composición de la presente invención con la del estado de la técnica.

La estabilidad de almacenamiento del bevacizumab reenvasado se compara con la composición oftálmica de la presente invención y la del bevacizumab reconstituido y los resultados se presentan en la Tabla 6 más abajo.

Tabla 6: Comparación de la estabilidad al almacenamiento de la composición del estado de la técnica con la de la presente invención

S. Núm.	Artículo de investigación	Período de Estabilidad en el estudio
1	Quality of bevacizumab compounded for intravitreal administration. Eye. 2013;27(9):1090-7.	14 días
2	Storage stability of bevacizumab in polycarbonate and polypropylene syringes. Eye. 2015;29(6):820-7.	6 meses
3	Silicone Oil Microdroplets and Protein Aggregates in Repackaged Bevacizumab and Ranibizumab: Effects of Long-term Storage and Product Mishandling. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52(2): 1023–1034.	3 meses
4	Long-term stability of bevacizumab repackaged in 1 mL polypropylene syringes for intravitreal administration. Retina. 2010;30(6):887-92.	3 meses
5	Quantification, Microbial Contamination, Physico-chemical Stability of Repackaged Bevacizumab Stored Under Different Conditions. Curr Pharm Biotechnol. 2014;15(2):113-9.	3 meses
6	Six-month stability of bevacizumab (AVASTIN) binding to Vascular endothelial growth factor after withdrawal into a syringe and refrigeration or freezing. Retina. 2006;26(5):519-22.	6 meses
7	Composición oftálmica de la presente invención	24 meses

En la presente invención, se encuentra que la composición de la presente invención es estable durante dos años, lo que es significativamente diferente de las composiciones del estado de la

técnica anterior, como se ha visto anteriormente, lo que proporciona una ventaja económica y una ventaja de transporte.

C. Comparación de la concentración de Bevacizumab de la presente invención con la composición del estado de la técnica:

En un estudio, “Retina2006;26(5):519-22”, se demostró la degradación de bevacizumab que se extrajo en una jeringa de tuberculina de plástico que se usa comúnmente para la preparación de fármacos en la mayoría de los países. El fármaco se almacenó durante seis meses a 4 °C. El patrón de degradación se observó como se menciona más abajo en la Tabla 7 a continuación:

Tabla 7: Estabilidad de la composición de la composición del estado de la técnica.

Punto temporal de estabilidad de compuesto de Bevacizumab	Concentración media de bevacizumab (mg/mL)	Degradación de bevacizumab (%)
0 días	25.1	0.0
1 semana	24.7	1.6
1 mes	23.1	8.0
3 meses	22.9	8.8
6 meses	21.1	15.9

A los 6 meses se observó un 15.9 % de degradación en el compuesto de bevacizumab del estado de la técnica.

En la presente invención, no se ha observado degradación de la proteína en un período de dos años, lo que también se evidencia mediante el ensayo de % de eficiencia de unión (ELISA) y % de potencia de neutralización de VEGF durante los dos años de período de estabilidad (consulte la tabla 8).

Tabla 8: Composición de la presente invención

Ensayo	Especificación	Inicio	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses
*Promedio de % de eficiencia de	NLT 80.0 % y NMT 125.0 % de	106.05	96.3	102.75	106.75	106.55	104.15	99.75

unión (ELISA)	la potencia indicada							
*Potencia promedio de neutralización de VEGF %	80 %–125 % de la potencia indicada	107.1 5	106.2	97.9	100.9	104.45	101.85	95.55

*El promedio se calcula a partir de dos lotes de estabilidad de PFS que contienen bevacizumab de grado oftálmico.

Por lo tanto, la presente invención como se presenta en la composición descrita en la presente descripción, formulada con el bevacizumab obtenido por el proceso como se presenta en este documento y en la jeringa precargada como se describe en este documento, solo posee las características de producto deseadas, la estabilidad y la eficacia.

La composición, el proceso para preparar la composición y el dispositivo que comprende la composición, tal como una jeringa precargada, se logra después de considerables esfuerzos humanos y experimentación y tiene sus méritos inherentes.