

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202290354** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2022.06.15

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)  
*C07K 16/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.07.31

---

(54) **ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ БЕВАЦИЗУМАБА**

---

(31) 201921017385

(32) 2019.08.01

(33) IN

(86) PCT/IN2020/050677

(87) WO 2021/019576 2021.02.04

(71) Заявитель:  
**ДЖЕННОВА  
БИОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ  
ЛИМИТЕД (IN)**

(72) Изобретатель:

**Гарима Кушал, Кавирадж Сварненду,  
Рагхуванши Арджун, Сингх Санджэй  
(IN)**

(74) Представитель:

**Хмара М.В. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к офтальмологической композиции бевацизумаба в одноразовом предварительно заполненном шприце, являющейся безопасной, нетоксичной и эффективной для введения в течение срока годности, отличающейся тем, что в офтальмологическом растворе контролируется количество механических включений, невидимых невооруженным глазом, со значительно сниженным уровнем эндотоксинов и низким уровнем агрегатов, подходящей для интравитреального применения в течение срока годности продукта, составляющего 2 года.

---

**A1**

**202290354**

**202290354**

**A1**

# ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ БЕВАЦИЗУМАБА

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и доставки  
5 лекарственных средств. В частности, настоящее изобретение относится к офтальмологической композиции бевацизумаба и устройству, содержащему указанную композицию.

## ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Бевацизумаб представляет собой рекомбинантное гуманизованное  
10 моноклональное антитело, содержащее человеческие каркасные области и определяющие комплементарность области мышинового антитела, которое связывается с человеческим фактором роста эндотелия сосудов (англ. VEGF) и ингибирует его биологическую активность. Бевацизумаб зарегистрирован в качестве торговой марки для лечения различных видов рака, включая метастатический  
15 колоректальный рак (англ. mCRC), неплоскоклеточный немелкоклеточный рак легких (англ. NSCLC), метастатический рак молочной железы (англ. MBC), метастатическую почечно-клеточную карциному (англ. mRCC), глиобластому и позднюю стадию рака шейки матки. При этих показаниях бевацизумаб доказал свою эффективность с точки зрения безопасности и выживаемости пациентов. Кроме  
20 того, бевацизумаб также применяют в качестве лекарственного средства вне зарегистрированных показаний для лечения влажной формы возрастной макулярной дегенерации (англ. wAMD), хороидальной неоваскуляризации (CNV), диабетического макулярного отека (англ. DME), окклюзии вены сетчатки (англ. RVO) и неоваскулярной глаукомы (англ. NVG). В качестве альтернативы, в продаже также  
25 имеется другое моноклональное антитело, ранибизумаб, одобренное USFDA (англ. United States Food and Drug Administration – Управление по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств) лекарственное средство для лечения wAMD, CNV, DME и т.д. Хотя, по-видимому, между бевацизумабом и ранибизумабом нет различий в эффективности и безопасности, что было подтверждено  
30 несколькими исследованиями, однако имеется значительное ценовое преимущество при использовании бевацизумаба вместо ранибизумаба.

Поскольку бевацизумаб одобрен для лечения рака, он доступен во флаконах емкостью 100 мг или 400 мг, предназначенных для обеспечения полной дозы для человека в зависимости от массы тела. При использовании бевацизумаба при

лечении wAMD офтальмологи обычно вводят интравитреально значительно меньшее количество, до 1,25 мг на дозу, возможно, многократно из небольшого флакона (использование нескольких доз). Любое лекарственное средство, предназначенное для интравитреального введения (введения в стекловидное тело),  
5 следует готовить и хранить в стерильной среде. При приготовлении инъекции во флаконе путем забора восстановленного раствора в устройство перед введением существует риск загрязнения. Применение загрязненного лекарственного средства подвергает пациента риску заражения дополнительными инфекциями, такими как эндофтальмит, альфа-гемолитический стрептококк. В некоторых странах врачи сами  
10 отбирают требуемое лекарственное средство из оригинального флакона, при этом используя один и тот же флакон для нескольких последовательных пациентов, что, как было доказано, является ошибочной практикой с точки зрения безопасности пациента, поскольку с увеличением количества проколов одного и того же флакона повышается вероятность заражения и инфицирования пациентов. Кроме того,  
15 может иметь место низкая точность дозирования из-за ошибки, связанной с человеческим фактором, со стороны обслуживающего медицинского или среднего медицинского персонала.

В некоторых странах рецептурно-производственные отделы аптек переупаковывают содержимое оригинального флакона в несколько шприцов.  
20 Необходимость переупаковки лекарственного средства из флакона доступного размера в меньшую дозу повышает вероятность передачи заражения, тем более что во время таких процедур сложно поддерживать стерильные условия и отсутствует возможность проверить, соблюдаются ли стерильные условия при выполнении таких процедур в рецептурно-производственных отделах аптек. В  
25 нескольких случаях FDA (англ. Food and Drug Administration – Управление по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств) оформило документально и опубликовало предупреждение относительно использования методов асептики и контроля дозировки в таких аптеках с рецептурно-производственными отделами, однако подобная практика по-прежнему широко  
30 распространена. Кроме того, некоторые аптеки с рецептурно-производственными отделами отзывали переупакованные шприцы с бевацизумабом из-за проблем со стерильностью, так что в настоящее время USFDA предостерегает медицинский и средний медицинский персонал от использования переупакованных инъекций бевацизумаба для внутриглазного применения. Вместе с тем, поскольку  
35 бевацизумаб производится для внутривенного введения, очень важное значение имеет критерий гранулометрического распределения. При отсутствии контроля за

частицами они могут вызывать раздражение и/или воспаление в таком чувствительном органе, как глаз. Сообщалось, что в таких переупакованных офтальмологических растворах для инъекций гранулометрическое распределение частиц выходит за пределы, установленные Фармакопеей США, и, как правило, не стандартизировано и не единообразно в разных аптеках с рецептурно-производственными отделами.

Помимо проблем безопасности, само лекарственное средство может иметь различную эффективность, обусловленную аликвотой продукта, выполнением процедуры и распределением. Снижение качества также может быть связано с конкретной используемой упаковкой, а снижение стабильности переупакованного бевацизумаба – с длительностью хранения. Помимо потенциальных последствий таких изменений в плане безопасности, может пострадать также и эффективность препарата. Кроме того, предметом озабоченности также является стабильность при хранении переупакованного бевацизумаба, поэтому в руководстве, выпущенном DCGI (англ. Drug Controller General of India – Управление по контролю за оборотом лекарственных средств Индии) Индии, касающемся переупаковки бевацизумаба, рекомендуется использовать переупакованные шприцы с бевацизумабом в течение не более 14 дней в определенных условиях во избежание деградации и денатурации. Однако не существует эффективного механизма определения предельного срока годности после восстановления и/или денатурации или деградации в период хранения. Дальнейшее восстановление упакованного продукта для его введения является сложной и трудоемкой процедурой и не всегда может привести к получению однородного раствора. Более того, имеются сообщения, согласно которым контрафактный авастин дополнительно отслеживается на международном уровне, что становится все более сложной задачей, поскольку все более усложняется международная сеть поставок.

Некоторые проблемы, связанные с разделением бевацизумаба на небольшие порции для интравитреального применения и контрафактным бевацизумабом, могут быть уменьшены за счет введения строгих нормативных рекомендаций, однако проблемы предшествующего уровня техники, такие как предельное содержание бактериальных эндотоксинов (BET, bacterial endotoxins test – испытание на бактериальные эндотоксины) и предельные значения при испытании на механические включения (англ. PMT, Particulate matter test – испытание на механические включения), требуют конкретных технических решений и производственного контроля для устранения проблем предшествующего уровня

техники и получения продукта, подходящего для офтальмологических интравитреальных инъекций.

Появляется все больше сообщений о нежелательных явлениях, связанных с интравитреальной инъекцией бевацизумаба, включая случаи стерильного  
5 внутриглазного воспаления, инфекционного эндофтальмита и повышения внутриглазного давления. Некоторые зарегистрированные нежелательные явления, связанные с интравитреальным введением бевацизумаба, могут быть обусловлены способом его изготовления либо ухудшением качества лекарственного средства из-за его переупаковки в пластиковые шприцы. Наряду с этим, ухудшают состояние  
10 мелкие частицы силикона, поступающие из игл и шприцов, используемых для интравитреальных инъекций.

Имеют место следующие проблемы, связанные с качеством продуктов предшествующего уровня техники:

- В настоящее время бевацизумаб соответствует только стандартам  
15 качества для внутривенного введения, а не более жестким офтальмологическим стандартам в отношении частиц, невидимых невооруженным глазом, и уровней эндотоксинов.

- В случае интравитреальной инъекции присутствие частиц, невидимых невооруженным глазом, и/или силиконового масла имеет решающее значение  
20 (накопление в глазу, что может привести к потенциальному тяжелому внутриглазному воспалению).

- Отсутствуют данные, позволяющие оценить качество продукта после его переупаковки как с микробиологической, так и с физико-химической точек зрения. Также не учитывается совместимость раствора с его первичной упаковкой.

- В большинстве стран не проводилось изучения сроков годности переупакованного бевацизумаба и влияния на безопасность и качество.

Таким образом, существует острая потребность в офтальмологической композиции бевацизумаба, которая была бы безопасной, нетоксичной и эффективной для однократного применения с длительным сроком годности.

## 30 ОБЪЕКТ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Объектом изобретения является предложение офтальмологической композиции бевацизумаба с контролируемым содержанием механических включений, бактериального эндотоксина, агрегатов в течение срока годности;

способа получения композиции и устройства для введения композиции, являющихся безопасными, нетоксичными и эффективными для одноразового применения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении раскрыта офтальмологическая композиция бевацизумаба, которую применяют в виде одноразового предварительно заполненного шприца. В офтальмологической композиции по настоящему изобретению контролируется предельное содержание эндотоксинов при испытании на бактериальные эндотоксины (ВЕТ), механических включений и агрегатов в течение срока годности композиции, соответствующего 2 годам. В настоящем изобретении также предложен способ получения активного ингредиента, представляющего собой бевацизумаб, с незначительным содержанием или не содержащего бактериальных эндотоксинов по результатам испытания на бактериальные эндотоксины (ВЕТ) и с незначительным содержанием или не содержащего механических включений, при этом композиция по настоящему изобретению в готовом виде имеет очень низкий уровень агрегатов, ВЕТ и механических включений в течение ее срока годности и подходит для интравитерального применения. В изобретении также предложено устройство, такое как предварительно заполненный шприц или набор, содержащее офтальмологическую композицию бевацизумаба.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 изображена схема получения офтальмологической композиции по настоящему изобретению с контролируемым количеством механических включений, невидимых невооруженным глазом, низким уровнем эндотоксинов в течение срока годности продукта.

На Фиг. 2a и Фиг. 2b показан размер частиц, невидимых невооруженным глазом, образца по настоящему изобретению в сравнении с другими образцами предшествующего уровня техники.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Офтальмологическая композиция бевацизумаба являющаяся безопасной, нетоксичной и эффективной для введения в течение срока годности, отличается тем, что в офтальмологической композиции контролируются количество механических включений, невидимых невооруженным глазом, низкие уровни эндотоксинов, агрегаты в течение срока годности продукта.

Офтальмологическая композиция по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой раствор. Офтальмологический раствор может быть представлен в виде отдельных предварительно заполненных шприцов для инъекций.

5 Офтальмологическую композицию по настоящему изобретению контролируют на механические включения. Механические включения состоят из подвижных нерастворимых частиц, происходящих из любого компонента композиции, примесей и любой подвижной фазы, отличных от пузырьков газа, случайно присутствующих в растворах, где механические включения, невидимые  
10 невооруженным глазом, для интравитреальных инъекций включают:

- (i) от 1 до 50 частиц диаметром  $\geq 10$  мкм на мл,
- (ii) от 0 до 5 частиц диаметром  $\geq 25$  мкм на мл и
- (iii) от 0 до 2 частиц диаметром  $\geq 50$  мкм на мл.

Присутствие эндотоксинов в рекомбинантных терапевтических средствах  
15 вызывает серьезные опасения из-за разнообразной и потенциально опасной биологической активности этих молекул. Поддержание стерильности во время процессов, используемых при производстве биологических препаратов, вместе со строгими протоколами подготовки оборудования помогает обеспечивать приемлемо  
20 низкие уровни эндотоксинов в продуктах. Из литературных данных также очевидно, что из переднего и заднего сегментов глаза задний сегмент (место интравитреальной инъекции) является более чувствительным к эндотоксину, и время пребывания эндотоксина в этом сегменте значительно больше из-за более высокой вязкости и меньшего потока жидкости в полость стекловидного тела, что приводит к медленному восстановлению клеточной реакции стекловидного тела. В  
25 зависимости от чувствительности пациентов даже минимальные уровни эндотоксинов могут привести к внутриглазному воспалению. Интравитреальные инъекции бевацизумаба проводят каждый месяц, причем при wAMD в год требуется от 7 до 8 инъекций. Чтобы избежать накопления эндотоксина в глазу при частых интравитреальных инъекциях, необходимо поддерживать как можно более низкие  
30 уровни эндотоксинов. В некоторых случаях сообщалось о последствиях стерильного эндофтальмита и повышении внутриглазного давления, развившихся после внутриглазной инъекции бевацизумаба. И хотя существует несколько теорий относительно этиологии внутриглазного воспаления, его причины до сих пор неизвестны. Предполагают, что основную роль в этих стерильных реакциях играют

эндотоксины, являющиеся побочными продуктами промышленного производства иммуноглобулинов.

За последнее время появилось несколько сообщений о TASS-подобном культурально-негативном стерильном эндофтальмите (англ. TASS, toxic anterior segment syndrome – токсический синдром переднего сегмента глаза) после IVB инъекций (англ. IVB injections, intravitreal bevacizumab injections – интравитреальные инъекции бевацизумаба). Это может быть вызвано эндотоксинами, связанными с продуктами распада из-за неправильного хранения. По мере роста числа IVB инъекций количество таких случаев, несомненно, будет возрастать, что обуславливает необходимость поиска разумного способа решения подобных ситуаций. Этиология стерильного эндофтальмита плохо изучена. Однако существует множество возможных объяснений. Например, повышенный риск заражения бактериальными эндотоксинами может нести распространенная практика разделения на отдельные аликвотные части коммерчески доступных флаконов бевацизумаба, применяемая в качестве экономически эффективного метода. Композиции бевацизумаба предшествующего уровня техники при введении содержат следы эндотоксинов в количествах, которые считаются безопасными для внутривенного введения, но которые, тем не менее, могут вызвать воспалительную реакцию при интравитреальном введении. При постинъекционном эндофтальмите важную роль также играют дополнительные манипуляции с лекарствами, происходящие во время приготовления рецептуры. Беспокойство по поводу переупаковки бевацизумаба для интравитреальной инъекции возрастает из-за нескольких вспышек инфекционного эндофтальмита, отмеченных в США.

В офтальмологической композиции по настоящему изобретению уровень концентрации эндотоксинов контролируется в диапазоне от 0,001 до 0,4 ЕЭ/мг (англ. EU, endotoxin unit – единиц эндотоксина) и, предпочтительно, в диапазоне от 0,001 до 0,2 ЕЭ/мг и, более предпочтительно, в диапазоне от 0,001 до 0,16 ЕЭ/мг.

Офтальмологическая композиция по настоящему изобретению может не содержать агрегатов в течение установленного срока годности или может содержать агрегаты в диапазоне от 0,1 до 5%, более предпочтительно, от 0,1 до 4% и, наиболее предпочтительно, от 0,1 до 3,5%, в течение периода от 2 до 3 лет, предпочтительно, от 2 до 2,5 лет, наиболее предпочтительно, в течение 2 лет.

В офтальмологической композиции по настоящему изобретению можно поддерживать предельные значения по содержанию бактериальных эндотоксинов, механических включений и агрегатов на протяжении срока годности, даже если



холодовая цепь периодически прерывается в течение короткого периода времени, например, во время транспортировки. В указанном контексте продукт по настоящему изобретению обладает очень хорошей переносимостью с точки зрения стабильности и эффективности.

5           Офтальмологическая композиция по настоящему изобретению не имеет различий в дозе между единицами, поскольку они могут быть предварительно автоматически заполнены до определенной дозы. В дальнейшем доза, содержащаяся в отдельной единице, остается неизменной на протяжении установленного срока годности.

10           Офтальмологическая композиция бевацизумаба по настоящему изобретению имеет:

15           а.       содержание бактериального эндотоксина по результатам испытания на бактериальные эндотоксины (БЕТ) в диапазоне от 0,001 до 0,4 ЕЭ/мг и, предпочтительно, в диапазоне от 0,001 до 0,2 ЕЭ/мг и, более предпочтительно, в диапазоне от 0,001 до 0,16 ЕЭ/мг;

          b.       где механические включения представляют собой:

          i.       от 1 до 50 частиц диаметром  $\geq 10$  мкм на мл,

          ii.      от 0 до 5 частиц диаметром  $\geq 25$  мкм на мл и

          iii.     от 0 до 2 частиц диаметром  $\geq 50$  мкм на мл; и

20           c.       где композиция содержит от 0,1 до 5%, более предпочтительно, от 0,1 до 4% и, наиболее предпочтительно, от 0,1 до 3,5% агрегата в течение периода от 2 до 3 лет, предпочтительно, от 2 до 2,5 лет, наиболее предпочтительно, в течение 2 лет.

25           Согласно другому варианту осуществления, предложен способ получения композиции, контролируемой в отношении количества механических включений, невидимых невооруженным глазом, низких уровней эндотоксинов и по существу или полностью не содержащей силиконового масла в течение срока годности продукта по настоящему изобретению, включающий в себя стадии:

30           i. культивирования клеток бевацизумаба методом непрерывной ферментации в клетках СНО (англ. Chinese hamster ovary – яичник китайского хомячка);

          ii. подвергания бесклеточного сбора, полученного из клеточной культуры СНО, глубинной фильтрации на основе адсорбции для дополнительного осветления;

iii. концентрирования образца со стадии (ii) с использованием однопроходной тангенциальной поточной фильтрации для получения концентрированного сбора;

iv. подвергания концентрированного сбора со стадии (iii) хроматографии на основе белка А для улавливания бевацизумаба и получения элюата, содержащего частично очищенный бевацизумаб;

v. подвергания элюата со стадии (iv) вирусной инактивации при низком значении pH с получением образца с инаktivированными вирусами;

vi. подвергания образца с инаktivированными вирусами, со стадии (v) дальнейшей катионообменной хроматографии для дополнительной очистки с получением элюата, содержащего в основном бевацизумаб высокой степени очистки;

vii. подвергания элюата со стадии (vi) анионообменной хроматографии для удаления следовых примесей, например, белков клетки-хозяина (HCP), ДНК клетки-хозяина (HCD), эндотоксины;

viii. подвергания элюата со стадии (vii) фильтрации для снижения вирусной нагрузки и полного удаления вирусов;

ix. концентрирования и диафильтрации образца со стадии (viii) с получением бевацизумаба; и

x. составления композиции бевацизумаба по настоящему изобретению из образца, полученного на стадии (ix).

Вирусную инаktivацию при низком pH можно проводить при величине pH в диапазоне от pH 3,0 до 5,0, предпочтительно, в диапазоне от 3,0 до 4,0, наиболее предпочтительно, в диапазоне от pH 3,5 до 4,0.

При проведении катионообменной хроматографии элюата можно использовать матрицу или неподвижную фазу, выбранную из группы, включающей  $\text{SO}_3^-$ сульфоизобутил,  $\text{SO}_3^-$ сульфоэтил, сульфопропил, карбоксиметил и т.д., предпочтительно, используемой хроматографической матрицей или неподвижной фазой является сульфонат.

При проведении анионообменной хроматографии элюата можно использовать матрицу или неподвижную фазу, выбранную из группы, включающей диэтиламиноэтил, четвертичный амин, поликватерниума, N-бензил-N-метилэтаноламин и т.д., предпочтительно, используемой хроматографической матрицей или неподвижной фазой является четвертичный амин.

Диафильтрацию можно проводить в присутствии диафильтрационного буфера TFF-II (англ. TFF, Tangential Flow Filtration – фильтрация в тангенциальном потоке).

5 Описанный в настоящем документе способ позволяет получить продукт и композицию с требуемым эффектом эндотоксинов. Например, уровень эндотоксинов можно снижать последовательно, как показано ниже (см. Таблицу А):

Таблица А

Описание уровня эндотоксинов на основании способа по настоящему изобретению

Стадии способа	Уровни эндотоксинов после каждой стадии
Однопроходная тангенциальная поточная фильтрация (SPTFF)	NMT 10 ЕЭ/мг
Хроматография на основе белка А	NMT 10 ЕЭ/мг
Катионообменная хроматография	NMT 5 ЕЭ/мг
Анионообменная хроматография	Менее 0,5 ЕЭ/мг
На выходе	Менее 0,16 ЕЭ/мг

10 Из представленной выше Таблицы А видно, что способ по настоящему изобретению приводит к снижению содержания эндотоксинов в несколько раз, что установлено методом гель-тромб теста. До очистки собранной жидкой среды содержание в ней эндотоксинов является очень высоким. После аффинной очистки с белком А содержание эндотоксинов составляет не более 10 ЕЭ/мг, что обычно значительно превышает допустимый уровень. В дополнение к этому для отделения  
15 и удаления эндотоксинов из активного вещества – бевацизумаба – была использована анионообменная хроматография.

По окончании стадии анионообменной хроматографии содержание эндотоксинов в белке составляет менее 0,5 ЕЭ/мг. Использование анионообменной хроматографии в способе по настоящему изобретению позволяет контролировать  
20 критические характеристики качества лекарственного препарата, например, ВЕТ, бионагрузку, содержание агрегатов и РМТ в более узком диапазоне.

Стадия удаления эндотоксинов является одной из самых сложных в последующем процессе очистки. Для обеспечения достижения предельных значений эндотоксинов в бевацизумабе по настоящему изобретению необходимо  
25 получить офтальмологическую композицию, имеющую концентрацию эндотоксинов

менее 0,4 ЕЭ/мг, предпочтительно, менее 0,2 ЕЭ/мг и, более предпочтительно, менее 0,16 ЕЭ/мг. Кроме того, способ должен включать в себя:

- (i) Использование стерильных растворов и оборудования для сведения к минимуму проникновения микроорганизмов,
- 5 (ii) Использование при очистке фильтрации через фильтры с размером пор 0,22 микрон,
- (iii) Работу при низкой температуре для сведения к минимуму роста микробов,
- (iv) Добавление при очистке бактериостатических агентов,
- 10 (v) Использование высококачественных исходных материалов,
- (vi) Использование ортогональных стадий очистки,
- (vii) Тщательную безразборную мойку (англ. CIP) емкостей, колонн и технологического оборудования.

15 Способ по настоящему изобретению, раскрытый в настоящем документе, является новым и приводит к получению продукта с требуемыми параметрами. Для получения продукта с требуемыми свойствами способ следует выполнять в последовательности, изложенной в настоящем документе. Данный способ является результатом многочисленных экспериментов, проб и ошибок.

20 Способ по настоящему изобретению обеспечивает офтальмологическую композицию бевацизумаба:

- a. где предельные значения при испытании на бактериальные эндотоксины (БЕТ) находятся в диапазоне от 0,001 до 0,4 ЕЭ/мг и, предпочтительно, в диапазоне от 0,001 до 0,2 ЕЭ/мг и, более предпочтительно, в диапазоне от 0,001 до 0,16 ЕЭ/мг;
- 25 b. где механические включения представляют собой:
  - i. от 1 до 50 частиц диаметром  $\geq 10$  мкм на мл,
  - ii. от 0 до 5 частиц диаметром  $\geq 25$  мкм на мл, и
  - iii. от 0 до 2 частиц диаметром  $\geq 50$  мкм на мл; и
- c. где композиция содержит от 0,1 до 5%, более предпочтительно, от 0,1 до 4% и, наиболее предпочтительно, от 0,1 до 3,5% агрегата в течение периода от 2
- 30

до 3 лет, предпочтительно, от 2 до 2,5 лет, наиболее предпочтительно, в течение 2 лет.

Согласно другому варианту осуществления, в настоящем изобретении раскрыта офтальмологическая композиция, содержащая бевацизумаб, буфер, стабилизатор и поверхностно-активное вещество.

Концентрация бевацизумаба в композиции может составлять от 24 мг/мл до 26 мг/мл, предпочтительно, от 25 мг/мл до 26 мг/мл, более предпочтительно, 25 мг/мл.

Буфер, присутствующий в композиции, может быть выбран из группы, состоящей из фосфатного, цитратного, ацетатного, гистидинового, сукцинатного, глюконатного, глицинового буферов и т.д., более предпочтительно, представляет собой фосфатный буфер. Концентрация буфера может предпочтительно составлять от 40 мМ до 60 мМ, более предпочтительно, от 50 мМ до 60 мМ. Величина pH буфера, предпочтительно, может находиться в диапазоне от 6,0 до 7,0, более предпочтительно, от 6,1 до 6,3.

Стабилизатор может представлять собой сахарид. Сахарид может быть моносахаридом, дисахаридом, трисахаридом, полисахаридом, сахарным спиртом, восстанавливающим сахаром, невосстанавливающим сахаром и т.д. Примеры сахара в настоящем документе включают глюкозу, сахарозу, трегалозу, лактозу, фруктозу, мальтозу, декстран, глицерин, декстран, эритрит, глицерин, арабит, силит, сорбит, маннит, мелибиозу, мелицитозу, рафинозу, маннотриозу, стахиозу, мальтозу, лактулозу, мальтулозу, глюцит, мальтит, лактит, изомальтулозу и т.д. Предпочтительным сахаридом может быть невосстанавливающий дисахарид, такой как трегалоза.

Количество сахара в композиции может находиться в диапазоне от 40 мг/мл до 70 мг/мл, предпочтительно, в диапазоне от 45 мг/мл до 65 мг/мл, более предпочтительно, в диапазоне от 50 мг/мл до 60 мг/мл.

Поверхностно-активное вещество, присутствующее в композиции, относится к поверхностно-активному агенту, предпочтительно, представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество. Примеры поверхностно-активных веществ по настоящему документу включают полисорбат (например, полисорбат 20 и полисорбат 80). Предпочтительным поверхностно-активным веществом в контексте данного документа является полисорбат 20.

Количество поверхностно-активного вещества в композиции может находиться в диапазоне от 0,2 мг/мл до 0,6 мг/мл, предпочтительно, в диапазоне от 0,3 мг/мл до 0,5 мг/мл, более предпочтительно, в диапазоне от 0,35 мг/мл до 0,45 мг/мл.

5           Композиция по настоящему изобретению представляет собой гомогенный раствор, стабильный в течение срока годности продукта и, таким образом, является синергической композицией.

10           Согласно еще одному варианту осуществления, офтальмологическую композицию по настоящему изобретению можно вводить в виде заранее определенной дозы в форме флакона, картриджа, ручки или предварительно заполненного шприца, предпочтительно, в форме предварительно заполненного шприца, предпочтительно, одноразового предварительно заполненного шприца, с объемом наполнения от 140 мкл до 200 мкл и дозой 50 мкл. Композиция по существу или полностью свободна от силиконового масла.

15           Корпус шприца может быть изготовлен из материала, выбранного из группы, включающей в себя полимер или стекло, или знаки, нанесенные на любую поверхность; термопластичный материал; полиолефин, такой как полимер циклического олефина, сополимер циклического олефина или полипропилен; сложный полиэфир, такой как полиэтилентерефталат; поликарбонат; или любую их  
20 комбинацию или сополимер.

          Ограничитель хода поршня предварительно заполненного шприца может быть изготовлен из любого подходящего материала, выбранного из группы, состоящей из хлорбутилового каучука, бромбутилового каучука или других галогеналкиловых каучуков. Поршень может быть необязательно покрыт  
25 материалами, выбранными из группы, состоящей из кремния, фторполимеров, парилена и т.д. Такое покрытие можно использовать для сведения к минимуму любого взаимодействия и/или трения, которые могут возникать между различными частями устройства или между устройством и лекарственным средством во время хранения или транспортировки. Наконечник ограничителя хода поршня может быть  
30 плоским или выпуклым. Для непроницаемого закупоривания поршня и стенок цилиндрического корпуса могут быть использованы поршневые уплотнительные кольца. Ограничитель может быть силиконизирован или покрыт бром-, хлор-, фтор- или родственными полимерами.

Шприц необязательно может иметь покрытие. Внутреннее покрытие или слой выбран из группы, состоящей из клеевого покрытия, барьерного покрытия, рН-защитного покрытия или смазывающего покрытия, предпочтительно, представляет собой смазывающее покрытие со смазкой, выбранной из группы, состоящей из силиконового масла, фторполимера, парилена и родственных соединений, с содержанием от 0,1 мг до 0,4 мг силиконового масла. На изготовленный из боросиликатного стекла с низким содержанием кремния цилиндрический корпус шприца может быть распылением нанесено покрытие из эмульсии силиконового масла в воде с последующей фиксацией нагреванием (т.н. "запеченный силикон") или сшиванием. Такое покрытие и/или наслоение может применяться для сведения к минимуму любого взаимодействия и/или трения, которые могут возникнуть между разными частями устройства или между устройством и лекарственным средством во время хранения или транспортировки. Предпочтительно, предварительно заполненный шприц может быть полностью свободен от силиконового масла или вообще не содержать его.

Лекарственная форма с заранее определенной дозировкой по настоящему изобретению, такая как предварительно заполненный шприц, может быть заполнена инертным газом, выбранным из группы, состоящей из азота, аргона, гелия, предпочтительно, азотом. Предварительно заполненный фармацевтический шприц может иметь номинальный максимальный объем наполнения от 140 мкл до 200 мкл с дозой 50 мкл.

Композицию по настоящему изобретению можно вводить в виде предварительно заполненного шприца. Композиция по настоящему изобретению может быть помещена в предварительно заполненный шприц для интравитреальной инъекции. Для уменьшения вероятности попадания капель силиконового масла в глаз при инъекции предварительно заполненный шприц по настоящему изобретению может иметь цилиндрический корпус, который по существу или полностью свободен от силиконового масла. Предварительно заполненный шприц может иметь внутреннее покрытие из силиконового масла, такое внутреннее покрытие может содержать от 0,1 мг до 0,4 мг силиконового масла. В качестве альтернативы, предварительно заполненный шприц может быть покрыт изнутри клеевым покрытием или слоем, барьерным покрытием или слоем, рН-защитным покрытием или слоем и необязательно смазывающим покрытием, предпочтительно, покрытие может представлять собой фторполимер, парилен и родственные соединения. Согласно одному из вариантов осуществления,

предварительно заполненный шприц может быть полностью свободен от силиконового масла. На изготовленный из боросиликатного стекла с низким содержанием кремния цилиндрический корпус шприца может быть распылением нанесено покрытие из эмульсии силиконового масла в воде с последующей фиксацией нагреванием (т.н. "запеченный силикон") или сшиванием. Такое покрытие и/или наслоение может применяться для сведения к минимуму взаимодействия и/или трения, которые могут возникнуть между разными частями устройства или между устройством и лекарственным средством во время хранения или транспортировки.

10 В настоящем изобретении взаимодействие между содержимым и контейнером сведено к минимуму и имеет важное значение для сохранения эффективности, в особенности, для поддержания стабильности при длительном хранении/использовании в течение всего срока годности, составляющего 2 года. Заявитель выполнил несколько исследований и приложил усилия для того, чтобы  
15 данная проблема предшествующего уровня техники была при этом полностью решена.

Согласно еще одному варианту осуществления, офтальмологическая композиция по настоящему изобретению может применяться для лечения офтальмологических заболеваний. Офтальмологическое заболевание может быть  
20 выбрано из группы, включающей влажную форму возрастной макулярной дегенерации, хориоидальную неоваскуляризацию, ретинальную ангиоматозную пролиферацию, патологическую миопию, ангиоидные полосы сетчатки, болезнь Беста, ветелиформную дистрофию взрослых, центральную серозную хориоретинопатию, точечную внутреннюю хориоидопатию, мультифокальный  
25 хориоидит, синдром предполагаемого гистоплазмоза глаз, остеому хориоидеи, токсоплазмоз, увеит, ложную опухоль головного мозга, перипалиллярную идиопатическую неоваскуляризацию сетчатки, пролиферативную диабетическую ретинопатию, серповидно-клеточную ретинопатию, ретинопатию недоношенных, болезнь Илза, макулярный отек, диабетическую ретинопатию, окклюзию  
30 центральной вены сетчатки, окклюзию ветки вены сетчатки, псевдофакию, увеит, окклюзионный васкулит, пигментный ретинит, неоваскулярную глаукому, окклюзию центральной вены сетчатки, окклюзию ветки вены сетчатки, пролиферативную диабетическую ретинопатию, окклюзию центральной артерии сетчатки, глазной ишемический синдром, радиационно индуцированную, радиационную оптическую  
35 нейропатию, радиационную ретинопатию, рак молочной железы с метастазами в



хориоидею, меланома-ассоциированную неоваскуляризацию, макроневризму, вазопротлиферативную опухоль, болезнь Коатса, юстапапиллярную капиллярную гемангиому, идиопатическую макулярную телеангиозктазию, полипообразную хориоидальную васкулопатию, центральную серозную хориоретинопатию, 5 переднюю неартериитную ишемическую невропатию зрительного нерва, герпетическую неоваскуляризацию роговицы, рубцующуюся пемфигоидную неоваскуляризацию роговицы, неоваскуляризацию задней капсулы, неоваскуляризацию отторжения роговичного трансплантата, неоваскуляризацию, связанную с сухим глазом, ревизию фильтрационной подушки, дополнения к 10 фильтрующей хирургии глаукомы, предпочтительно, влажную форму возрастной макулярной дегенерации.

Согласно еще одному варианту осуществления, в настоящем изобретении предложен набор, содержащий офтальмологическую композицию по настоящему изобретению в удобной для введения форме, такой как предварительно 15 заполненный шприц, флакон или картридж, предпочтительно, предварительно заполненный шприц. Набор может включать в себя предварительно заполненный шприц, помещенный в блистерную упаковку, которая может быть стерильной внутри. Согласно одному из вариантов осуществления, шприцы в соответствии с изобретением могут быть помещены внутрь таких блистерных упаковок перед 20 стерилизацией, например, перед конечной стерилизацией. Блистерная упаковка может быть изготовлена из подходящего термопластичного материала, такого как стекло, полиолефин, полимер циклического олефина или сополимер циклического олефина, полипропилен или сложный полиэфир или любая их комбинация или сополимер. Набор также может включать в себя иглу для введения 25 офтальмологической композиции по настоящему изобретению.

Игла может быть любой иглой калибра от 29 до 33 × ½ дюйма, хотя в качестве альтернативы могут быть использованы иглы 31 калибра и 32 калибра, 33 калибра или 34 калибра. В набор также может входить листок-вкладыш с инструкцией по применению.

30 В настоящем изобретении раскрыт набор, содержащий офтальмологическую композицию в предварительно заполненном шприце, включающий в себя предварительно заполненный шприц, иглу калибра в диапазоне от 29 до 34, инструкции по применению в блистерной упаковке.

Композиция стабильна при температуре от 2 до 10°C, предпочтительно, от 2 35 до 8°C в течение по меньшей мере 2 лет. Офтальмологическая композиция по

настоящему изобретению стабильна в течение по меньшей мере 2 лет и не только сохраняет безопасность и простоту использования, но также имеет низкий уровень невидимых механических включений, ВЕТ и агрегатов в течение своего срока годности, равного двум годам.

5

## ПРЕИМУЩЕСТВА

Офтальмологическая композиция по настоящему изобретению имеет следующие преимущества, однако ее преимущества могут не ограничиваться перечисленными ниже:

- 10 • Продукт обладает высокой стабильностью по сравнению с другими шприцами предшествующего уровня, переупакованными из флакона .
- Имеет ВЕТ в пределах, указанных в настоящем документе.
- 15 • Содержит заранее определенную дозировку, что уменьшает ошибки при дозировании и обеспечивает утилизацию лекарственной формы после однократного введения, позволяя избегать многократное использование и тем самым предотвращая повторное использование и появление инфекций, возникающих в результате многократного использования.
- Обладает потенциально меньшими доинъекционными и постинъекционными эффектами.
- 20 • Имеет срок годности 2 года по сравнению с различными сроками годности от 14 дней до максимум 6 месяцев (в Индии – 14 дней, при этом FDA рекомендует ограничить срок годности только 5 днями после переупаковки) для продуктов предшествующего уровня техники.
- 25 • Композиция по настоящему изобретению содержит не более 50 частиц диаметром  $\geq 10$  мкм на мл, не более 5 частиц диаметром  $\geq 25$  мкм на мл и не более 2 частиц диаметром  $\geq 50$  мкм на мл.
- Бевацизумаб офтальмологического качества, содержащийся в предварительно заполненном шприце по настоящему изобретению, стабилен при температуре от 2 до 8°C в течение предписанного срока годности.
- 30 • Композиция по настоящему изобретению проходит все предписанные проверки качества при выпуске в отличие от переупакованных или смешанных композиций предшествующего уровня техники.

- Уменьшено количество посещений больниц, сокращено количество отходов лекарственных средств, сведены к минимуму больничные и промышленные отходы и устранен риск микробного заражения.

Настоящее изобретение проиллюстрировано с помощью примеров.

- 5 Представленные примеры предназначены для иллюстративных целей и их не следует рассматривать как ограничивающие.

## ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Пример 1

#### Способ очистки бевацизумаба

- 10 Бесклеточный сбор, содержащий моноклональное антитело к бевацизумабу, получали в перфузионных биореакторах из клеток CHO. Сбор фильтровали с помощью фильтра 0,2 мкм и подвергали глубинной фильтрации на основе адсорбции для осветления. Отфильтрованный сбор концентрировали с использованием модуля однопроходной фильтрации TFF для увеличения
- 15 концентрации бевацизумаба. "Концентрированный сбор", полученный на стадии TFF-I, фильтровали через фильтр 0,2 мкм и подвергали аффинной хроматографии на колонке, заполненной смолой Mab Select Sure LX (GE Healthcare). Колонку уравнивали уравнивающим буфером-1 (EB-1, фосфатный буфер: 20 мМ, NaCl: 150 мМ, pH 7,1 ± 0,2), пропуская 5 объемов колонки (англ. CV) буфера EB-1
- 20 при скорости потока 150 см/ч. Образец наносили на колонку при линейной скорости потока 150 см/ч с последующим пропуском 5 CV буфера EB-1 при скорости потока приблизительно 150 см/ч. После этого пропускали 5 CV промывочного буфера-1 (WB-1, ацетат натрия: 40 мМ, pH 6,0) при скорости потока 150 см/ч. Связанный целевой белок элюировали пропуском приблизительно 5 CV
- 25 элюирующего буфера-1 (EUB-1, ацетат натрия: 30 мМ, pH 3,5) и собирали фракцию с поглощением при длине волны 280 нм. Элюат (E-1) анализировали на количество белка, гликаны, НСР, заряженные изоформы, агрегаты и содержание эндотоксинов. На этой стадии содержание эндотоксинов в E-1 составляло не более (англ. NMT, not more than – не более, чем) 10 ЕЭ/мг, а содержание агрегатов составляло NMT 5%.
- 30 На следующей стадии E-1 подвергали инактивации при низком значении pH, где E-1 инкубировали при комнатной температуре при непрерывном слабом перемешивании в течение 60 минут при pH 3,7. После инактивации вирусов раствор разбавляли уравнивающим буфером-2 (EB-2, ацетат натрия: 50 мМ, NaCl: 80

мМ, рН 5,3) для СЕХ (англ. cation exchange chromatography – катионообменная хроматография) с последующей фильтрацией через фильтр 0,2 мкм. На следующей стадии катионообменную колонку (Capto S ImpAct, GE Healthcare) уравнивали с помощью 5 CV уравнивающего буфера-3 (ЕВ-3, ацетат натрия: 50 мМ, NaCl: 80 мМ, рН 5,3) при скорости потока 250 см/ч. Образец наносили на колонку при скорости потока 250 см/ч, после чего промывали 3 CV промывочного буфера-2 (WB-2, ацетат натрия: 50 мМ, NaCl: 80 мМ, рН 5,3) при скорости потока 250 см/ч. Через образец пропускали линейный градиент 0–15% В объемом 1,5 CV, затем 15–25% В объемом 20 CV, используя ЕВ-3 и элюирующий буфер-2 (ЕУВ-2, ацетат натрия: 50 мМ, NaCl: 500 мМ, рН 5,3) при скорости потока 250 см/ч, и собирали фракции при УФ 280. Элюат (Е-2) анализировали на количество белка, заряженные изоформы, агрегаты и содержание эндотоксинов. После этой стадии содержание эндотоксинов в Е-2 составляло NMT 5 ЕЭ/мг.

На следующей стадии объединяли фракции элюирования СЕХ на основании результатов анализа заряженной изоформы в Е-2 и разбавляли уравнивающим буфером (ЕВ-4, Tris: 20 мМ, рН 8,0) для АЕХ (англ. anion exchange chromatography – анионообменная хроматография), после чего фильтровали через фильтр 0,2 мкм. На следующей стадии анионообменную колонку (Capto Q, GE Healthcare) уравнивали с помощью 10 CV уравнивающего буфера-4 (ЕВ-4, Tris: 20 мМ, рН 8,0) при скорости потока 250 см/ч. Образец наносили на колонку при скорости потока 250 см/ч, затем промывали 2 CV промывочного буфера-3 (WB-3, ЕВ-4, Tris: 20 мМ, рН 8,0) при скорости потока 250 см/ч. Колонку регенерировали с помощью 5 CV регенерирующего буфера (Tris: 20 мМ, NaCl: 1М, рН 8,0) и собирали проточную фракцию (англ. FT, flow through) для последующего анализа, обозначив ее “АЕХ FT”. Фракцию анализировали на количество белка, гликаны, НСР, заряженные изоформы, агрегаты и содержание эндотоксинов. На этой стадии, содержание эндотоксинов составляло не более (NMT) 0,5 ЕЭ/мг, а содержание агрегатов составляло не более 3%. Далее “АЕХ FT” последовательно фильтровали через префильтр и нанофильтр с перепадом давления  $1,5 \pm 0,5$  бар, фильтрат после нанофильтра концентрировали и подвергали диафильтрации с буфером для диафильтрации (РВ: 51 мМ, дигидрат трегалозы: 20 мг/мл, рН  $6,0 \pm 0,2$ ). В образец после диафильтрации добавляли дигидрат трегалозы до получения конечной концентрации 60 мг/мл и 5% полисорбат 20 до получения конечной концентрации 0,04% и дополнительно разбавляли до достижения определенной концентрации бевацизумаба для получения лекарственного вещества бевацизумаба (англ. DS, drug substance – лекарственное вещество). DS

подвергали расширенным аналитическим исследованиям, включающим, не ограничиваясь перечнем, определение количества белка, гликанов, НСР, заряженных изоформ, агрегатов, содержания эндотоксинов, механических включений и анализы связывания с рецепторами *in vitro* и *in vivo*. В DS содержание эндотоксинов составляло менее 0,16 ЕЭ/мг, содержание агрегатов составляло 0,8%, а пределы содержания механических включений, невидимых невооруженным глазом, указанные ниже, находились в пределах, определенных настоящим изобретением.

- (i) частицы  $\geq 10$  мкм составляли не более 50 частиц/мл,
- (ii) частицы  $\geq 25$  мкм составляли не более 5 частиц/мл,
- (iii) частицы  $\geq 50$  мкм составляли не более 2 частиц/мл.

Возможность достижения пределов по настоящему изобретению в отношении уменьшения содержания эндотоксинов, агрегатов и снижения НСР представлена ниже в Таблице 1.

Таблица 1

Эффективность способа по настоящему изобретению

Стадии способа	Уровень эндотоксинов после каждой стадии	Уровень агрегатов после каждой стадии	Уровень НСР после каждой стадии
SPTFF	NMT 10 ЕЭ/мг	н/а	н/а
Хроматография на основе белка А	NMT 10 ЕЭ/мг	NMT 5%	NMT 5000 м.д.
Катионообменная хроматография	NMT 5 ЕЭ/мг	NMT 5%	NMT 200 м.д.
Анионообменная хроматография	Менее 0,5 ЕЭ/мг	Менее 3%	NMT 100 м.д.
DS бевацизумаба	Менее 0,16 ЕЭ/мг	0,8%	1 м.д.

Пример 2

Композиция в соответствии с настоящим изобретением

Бевацизумаб получали как описано в Примере 1. Композиция по настоящему изобретению может быть изготовлена с использованием различных ингредиентов, указанных ниже, как описано в Таблице 2.

Таблица 2

Иллюстративная офтальмологическая композиция по настоящему изобретению

	C1	C2	C3
Бевацизумаб	Бевацизумаб	Бевацизумаб	Бевацизумаб
Сахар	Сахароза	Трегалоза	Трегалоза
Буфер	Ацетатный буфер	Гистидиновый буфер	Фосфатный буфер
Поверхностно-активное вещество	Полисорбат 20	Полисорбат 20	Полисорбат 20

Композицию 3 (C3) использовали в дальнейших экспериментах, как описано ниже. Некоторые иллюстративные примеры представлены в Таблице 3.

5

Таблица 3

Офтальмологическая композиция по настоящему изобретению

	C31	C32	C33
Бевацизумаб	25 мг/мл	25 мг/мл	25 мг/мл
Трегалоза	50 мг/мл	70 мг/мл	60 мг/мл
Фосфатный буфер	55 мМ	45 мМ	51 мМ
Полисорбат	0,02%	0,03%	0,04%
pH	6,2	6,2	6,2

Композиция C33 по настоящему изобретению была дополнительно проанализирована ниже, результаты представлены в следующих примерах.

Пример 3

10

Аналитическое исследование композиции по настоящему изобретению в предварительно заполненном шприце

15

Одноразовый предварительно заполненный шприц использовали для заполнения офтальмологической композиции бевацизумаба, имеющей форму раствора. Три партии бевацизумаба в PFS (англ. pre-filled syringe – предварительно заполненный шприц) тщательно анализировали для определения физико-химических свойств, биологической активности, иммунохимических свойств, чистоты и примесей при помощи соответствующих методов. Характеристики продукта соответствуют критериям приемлемости, как показано в Таблице 4 ниже:

Таблица 4

## Аналитическое исследование бевацизумаба в PFS

№.	Испытание	Критерии приемлемости DP	Среднее для 3 партий	SD
1.	pH	6,0-6,4	6,13	0,06
2.	Концентрация белка (мг/мл)	25 ± 0,5 мг/мл	25,17	0,12
3.	Пептидная карта	Профиль пептидной карты раствора образца качественно аналогичен раствору стандартного образца	Соответствует	-
4.	Агрегация (%)	NMT 2 %	0,85	0,24
5.	Содержание гликанов (%)	Суммарное содержание всех олигосахаридов без галактозы: NLT (англ. not less than – не менее) 70,0%	84,13	2,64
6.	Заряженные изоформы (%)	Кислые NMT 45 % Основные NMT 5 %	14,43 0,83	2,26 0,12
7.	pI	Значение pI основного пика, полученного из раствора образца, отличается NMT ± 0,2 единиц pI от значения pI соответствующего пика, полученного из стандартного раствора	Соответствует	-
8.	Низкомолекулярные примеси (%)	NMT 5 %	2,03	0,32
9.	Примесь негликозилированных тяжелых цепей (%)	NMT 2,0%	0,77	0,12
10.	Связывающая способность (%)	80%–120% от заявленной способности	103,83	6,85
11.	Эффективность нейтрализации (%)	NLT 80,0% и NMT 120,0% от заявленной активности	103,67	6,11
12.	Частицы, невидимые невооруженным глазом ≥10 мкм	Не более 50/мл	22	7,64
13.	Частицы, невидимые невооруженным глазом ≥25 мкм	Не более 5/мл	1	0

#### Пример 4

#### Исследование стабильности композиции по настоящему изобретению в одноразовом PFS

5 Исследовали стабильность при долгосрочном хранении бевацизумаба (офтальмологического качества) в одноразовом PFS при температуре  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  в течение 24 месяцев. В PFS заполняли 25 мг/мл бевацизумаба, фосфатный буфер, полисорбат 20 и дигидрат трегалозы, pH 6,2. На протяжении всего исследования стабильности не было обнаружено значительных изменений концентрации белка и

10 величины pH. Данные исследований в течение 24 месяцев стабильности лекарственного препарата были тщательно проанализированы с точки зрения физико-химических свойств, биологической активности, иммунохимических свойств, чистоты и примесей, результаты указывают на то, что продукт стабилен при температуре  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  в течение 24 месяцев (Таблица 5).

15

#### Таблица 5

#### Исследование долгосрочной стабильности бевацизумаба офтальмологического качества при температуре $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение 24 месяцев

Испытание	Спецификация на конец срока годности	Начальное значение	3 месяца	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев	24 месяца
Внешний вид	Прозрачная жидкость от бесцветного до бледно-коричневого цвета, без видимых частиц	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
pH	6,0-6,4	6,10	6,23	6,03	6,11	6,18	6,35
Конц. белка (мг/мл)	$25,5 \pm 0,5$ мг/мл	25,10	25,07	25,23	25,15	25,20	25,37
SDS PAGE (англ. Sodium Dodecyl)	Основные полосы должны наблюдаться при 150 кДа в невосстановленном состоянии; при	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует



Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия )	50 кДа и 25 кДа в восстановленном состоянии						
% Эффективность связывания (ELISA )	80%–125% от заявленной эффективности	100,6	95,9	99,7	111,8	112,5	100,7
Эффективность нейтрализации VEGF (англ. Vascular Endothelial Cell Growth Factor – фактор роста клеток эндотелия сосудов )	NLT 80,0% и NMT 125,0% от заявленной эффективности	108,1	105,4	104,1	97,3	108,7	93,6
примеси NGHC	NMT 2,0 %	0,70	0,73	0,78	0,70	0,70	0,61

(англ. nonglycosylated heavy chain – негликозилированная тяжелая цепь), %							
Агрегация, %	NMT 3,0 %	0,81	1,32	1,47	1,93	2,01	2,64
Олигосахариды без галактозы, %	Суммарное содержание всех олигосахаридов без галактозы: NLT 70,0%	85,90	85,49	80,08	85,87	83,32	83,81
Частицы ≥10 мкм	Не более 50/мл	46	44	23	16	11	8
Частицы ≥25 мкм	Не более 5/мл	1	1	1	1	1	1

Характеристики продукта соответствуют критериям приемлемости в течение всего срока действия, что указывает на стабильность продукта при температуре 5°C ± 3°C в течение 24 месяцев.

В предшествующем уровне техники было установлено, что бевацизумаб, переупакованный из флакона (Avastin®) в шприцы, нестабилен в течение более длительного времени. Имеются сообщения, в которых качество бевацизумаба, переупакованного в условиях аптеки в пластиковые шприцы (изготовленные из изолипропилена и поликарбоната), для интравитреальной инъекции было проанализировано в течение 3 или 6 месяцев. По результатам этих исследований сообщалось об изменениях содержания иммуноглобулина G (IgG), наличии микрокапель силиконового масла, увеличении количества частиц, невидимых невооруженным глазом, и агрегации белков. Также было отмечено, что переупакованный бевацизумаб от разных поставщиков показал разное качество продукта. Согласно одному из предшествующих уровней техники, наблюдалось снижение анти-VEGF активности на 15,9% в течение 6-месячного периода стабильности переупакованного в условиях аптеки бевацизумаба.

Из-за проблем, связанных со стабильностью, USFDA разработало проект руководства, в котором предлагалось ограничить срок годности PFS, предварительно заполненного препаратом Avastin®, до 5 дней. В Индии Управление по контролю за оборотом лекарственных средств Индии (англ.DCGI) разработало руководство по процедуре переупаковки в условиях аптеки, при этом упоминалось, что использование таких шприцов не должно продолжаться более 14 дней. Таким образом, стабильность бевацизумаба в переупакованных шприцах в течение длительного времени с сохранением требуемых качеств является критически важной и влияет на воспаление глаз. Настоящее изобретение позволяет преодолеть эти ограничения и обеспечивает длительное хранение бевацизумаба, отвечая всем установленным здесь критериям приемлемости в течение срока годности.

По сравнению с литературными данными предшествующего уровня техники композиция по настоящему изобретению сохраняет размер частиц >10 мкм и >25 мкм в течение всего срока годности, составляющего 2 года. Офтальмологическая композиция по настоящему изобретению стабильна при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере 2 лет и является безопасной, нетоксичной и эффективной для введения в течение срока годности.

### Пример 5

#### Исследование токсичности композиции по настоящему изобретению

Для оценки токсичности бевацизумаба для глаз испытывали одноразовые предварительно заполненные шприцы, наполненные бевацизумабом офтальмологического качества, в отношении токсичности при многократном интравитреальном введении (4 недели) в глаза кролика с периодом восстановления продолжительностью 4 недели. Исследование проводили на оборудовании, соответствующем требованиям GLP (англ. Good Laboratory Practice – надлежащая лабораторная практика). В PFS заполняли 25 мг/мл бевацизумаба, 51 mM PB, 0,04% полисорбата 20 и 60 мг/мл дигидрата трегалозы, pH 6,2. Продукт соответствовал всем параметрам офтальмологической композиции в течение срока годности.

При применении в терапевтических целях при болезнях глаз бевацизумаб вводят непосредственно в стекловидное тело, представляющее собой особый отдел глаза. Исследуемый продукт бевацизумаб или контрольный образец носителя (разбавителя) вводили путем интравитреальных инъекций в оба глаза каждого

кролика, один раз в две недели в течение четырех недель, т.е. в 1, 15 и 29 дни в течение периода исследования.

Во время исследования наблюдали за частотой встречаемости летальных исходов и наличием признаков местной и системной токсичности у кроликов, затем их умерщвляли и подвергали полному вскрытию.

Дополнительные параллельные группы восстановления, состоявшие из трех кроликов каждого пола, при контроле носителем и высоком уровне дозы обрабатывали аналогично, но после прекращения периода лечения дополнительно наблюдали за реверсированием токсичности / отсроченной токсичностью, если таковые имелись, в течение 28 дней.

В ходе исследования была получена информация об органах-мишенях, возможности кумуляции, обратимости токсического действия, оценке воздействия дозы без отрицательного эффекта, которую использовали для установления критериев безопасности при воздействии на человека. При исследовании токсичности были выбраны три уровня доз. Уровень дозы бевацизумаба для кролика, использованный в исследовании, был кратен эквивалентной человеческой дозе (англ. HED, the human equivalent dose), т.е. 1,25 мг, 2,50 мг или 3,75 мг на глаз, что составляет соответственно 1X, 2X и 3X от абсолютной терапевтической дозы для человека, инъекцию вводили в объеме 50 мкл.

На основании результатов исследования был сделан вывод, что продукт не вызывает каких-либо системных эффектов, нежелательных или иных, у кроликов, получавших лечение при уровне дозы 3,75 мг на глаз и выше. Бевацизумаб офтальмологического качества хорошо переносился в глазах кроликов после его интравитреальных инъекций в дозах 1,25 мг, 2,50 мг или 3,75 мг на глаз; при этом было обнаружено, что доза, не приводящая к развитию наблюдаемого нежелательного эффекта (англ. NOAEL, no observed adverse effect level), офтальмологической композиции по настоящему изобретению у кроликов превышает 3,75 мг на глаз. Таким образом, в ходе интравитреальных доклинических исследований было установлено, что данное лекарственное средство является безопасным для интравитреального введения.

В частности, в изобретении предложены фармацевтические композиции со значительно сниженным уровнем эндотоксинов и содержанием механических включений, подходящие для интравитреального применения. Изобретение также относится к способам снижения уровня PMT и эндотоксинов в определенных

композициях, таких как фармацевтические композиции, применяемые для внутриглазной доставки.

### Пример 6

#### Сравнение композиции по настоящему изобретению с композицией предшествующего уровня техники

Композицию по настоящему изобретению, приготовленную, как описано в предшествующих примерах, сравнивали с существующими композициями, доступными в продаже, которые вводят пациентам.

#### А. Сравнение невидимых механических включений

Невидимые механические включения тестировали в соответствии с методом главы 789 USP (англ. U.S. Pharmacopeia – Фармакопея США) путем подсчета частиц в режиме светотени (англ. LOPC, Light Obscuration Particulate Count). Для испытания использовали не содержащие частиц стеклянные флаконы соответствующего объема. Образцы из 10 PFS объемом приблизительно 1 мл отбирали в один стеклянный флакон. Далее образец разбавляли водой, не содержащей частиц, до получения конечного объема 25 мл. Содержимое образца перемешивали, медленно переворачивая контейнер 20 раз, не допуская образования пузырьков воздуха, при этом все контейнеры объединяли в не содержащий частиц контейнер. Перед анализом контейнерам с образцами давали отстояться в течение по меньшей мере 15 минут для удаления пузырьков воздуха. Отбирали 4 порции, каждая не менее 5 мл, и подсчитывали количество частиц размером 10 мкм, 25 мкм и 50 мкм или больше. Результаты представляли без учета результата, полученного от первой порции.

Механические включения, невидимые невооруженным глазом, содержащиеся в переупакованном бевацизумабе из пяти аптек с рецептурно-производственными отделами Великобритании (S1–S5), сравнивали с офтальмологической композицией по настоящему изобретению (Eye (2013) 27,1090-1097). Результаты представлены в виде Фиг. 2а и 2b. На Фиг. 2а и 2b можно ясно видеть, что размер частиц по настоящему изобретению находится в пределах диапазона, указанного в настоящем изобретении, поэтому вероятность возникновения воспаления глаз является очень низкой.

#### В. Сравнение стабильности при хранении композиции по настоящему изобретению с композицией предшествующего уровня техники

Стабильность при хранении переупакованного бевацизумаба сравнивали с офтальмологической композицией по настоящему изобретению и восстановленным бевацизумабом, результаты представлены в Таблице 6 ниже.

Таблица 6

5 Сравнение стабильности при хранении композиции предшествующего уровня техники и композиции по настоящему изобретению

No. образца	Научная статья	Исследуемый период стабильности
1	Quality of bevacizumab compounded for intravitreal administration (Качество бевацизумаба, переупакованного в условиях аптеки, для интравитреального введения). Eye. 2013; 27(9): 1090-7.	14 дней
2	Storage stability of bevacizumab in polycarbonate and polypropylene syringes (Стабильность при хранении бевацизумаба в шприцах из поликарбоната и полипропилена). Eye. 2015; 29(6): 820-7.	6 месяцев
3	Silicone Oil Microdroplets and Protein Aggregates in Repackaged Bevacizumab and Ranibizumab: Effects of Long-term Storage and Product Mishandling (Микрокапли силиконового масла и белковые агрегаты в переупакованном бевацизумабе и ранибизумабе: последствия длительного хранения и неправильного обращения с продуктом). Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011; 52(2): 1023–1034.	3 месяца
4	Long-term stability of bevacizumab repackaged in 1 mL polypropylene syringes for intravitreal administration (Долгосрочная стабильность бевацизумаба, переупакованного в шприцы емкостью 1 мл из полипропилена для интравитреального введения). Retina. 2010; 30(6): 887-92.	3 месяца
5	Quantification, Microbial Contamination, Physico-chemical Stability of Repackaged Bevacizumab Stored Under Different Conditions (Количественная оценка, загрязнение микроорганизмами, физико-химическая стабильность переупакованного бевацизумаба при хранении в различных условиях). Curr Pharm Biotechnol. 2014; 15(2): 113-9.	3 месяца
6	Six-month stability of bevacizumab (AVASTIN)	6 месяцев

	binding to Vascular endothelial growth factor after withdrawal into a syringe and refrigeration or freezing (Стабильность в течение 6 месяцев бевацизумаба (AVASTIN), связывающегося с фактором роста эндотелия сосудов, после помещения в шприц и охлаждения или замораживания). Retina. 2006; 26(5): 519-22.	
7	Офтальмологическая композиция по настоящему изобретению	24 месяцев

В настоящем изобретении установлено, что композиция по настоящему изобретению стабильна в течение 2 лет; это значительно отличается от композиций предшествующего уровня техники, как показано выше, и обеспечивает экономические выгоды и преимущество при транспортировке.

5            **С. Сравнение концентрации бевацизумаба по настоящему изобретению с композицией предшествующего уровня техники**

В исследовании "Retina. 2006; 26(5): 519-22" было показано разложение бевацизумаба, помещенного в пластиковый туберкулиновый шприц, обычно используемый для приготовления лекарственного средства в большинстве стран.

10            Лекарственное средство хранили в течение 6 месяцев при температуре 4°C. Был отмечен характер разложения, такой как показан ниже в Таблице 7.

Таблица 7

Стабильность композиции предшествующего уровня техники

Время определения стабильности переупакованного в условиях аптеки бевацизумаба	Средняя концентрация бевацизумаба (мг/мл)	Разложение бевацизумаба (%)
0 день	25,1	0,0
1 день	24,7	1,6
1 месяц	23,1	8,0
3 месяца	22,9	8,8
6 месяца	21,1	15,9

15            Через 6 месяцев в переупакованном в условиях аптеки бевацизумабе предшествующего уровня техники наблюдалось 15,9% разложения.

В настоящем изобретении не наблюдалось разложения белка в течение 2-х лет, что было также подтверждено анализом эффективности связывания в %

(методом ELISA) и анализом эффективности нейтрализации VEGF в % в течение двухлетнего периода стабильности (см. Таблицу 8).

Таблица 8

Композиция по настоящему изобретению

Испытание	Спецификация	Исходное значение	3 месяца	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяца
*Средняя эффективность связывания, % (ELISA)	NLT 80,0% и NMT 125,0% от заявленной эффективности	106,05	96,3	102,75	106,75	106,55	104,15	99,75
*Средняя эффективность нейтрализации VEGF, %	80%–125% от заявленной эффективности	107,15	106,2	97,9	100,9	104,45	101,85	95,55

5 \*Среднее значение рассчитано для двух стабильных партий PFS, содержащих бевацизумаб офтальмологического качества

10 Таким образом, настоящее изобретение, представленное в виде в композиции, описанной в настоящем документе, изготовленной с использованием бевацизумаба, полученного способом, представленным в настоящем документе, в предварительно заполненном шприце, как раскрыто в настоящем документе, само по себе представляет требуемые характеристики продукта, стабильность и эффективность.

15 Композиция, способ получения композиции, устройство, содержащее композицию, такое как предварительно заполненный шприц, созданы в результате значительных затрат человеческого труда и проведения экспериментов и обладают присущими им достоинствами.



**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Офтальмологическая композиция бевацизумаба,
  - a. где предельные значения при испытании на бактериальные эндотоксины (ВЕТ) находятся в диапазоне от 0,001 до 0,4 ЕЭ/мг, предпочтительно, в диапазоне от 0,001 до 0,2 ЕЭ/мг и, более предпочтительно, от 0,001 до 0,16 ЕЭ/мг;
  - b. где механические включения представляют собой:
    - i. от 1 до 50 частиц диаметром 10 мкм или более на мл,
    - ii. от 0 до 5 частиц диаметром 25 мкм или более на мл и
    - iii. от 0 до 2 частиц диаметром 50 мкм или более на мл; и
  - c. где композиция содержит от 0,1 до 5%, более предпочтительно, от 0,1 до 4% и, наиболее предпочтительно, от 0,1 до 3,5% агрегата в течение периода от 2 до 3 лет, предпочтительно, от 2 до 2,5 лет, наиболее предпочтительно, в течение 2 лет.
2. Способ получения офтальмологической композиции по п. 1, включающий стадии, на которых:
  - i. культивируют клетки бевацизумаба методом непрерывной ферментации в клетках СНО;
  - ii. подвергают бесклеточный сбор, полученный из клеточной культуры СНО, глубинной фильтрации на основе адсорбции для дополнительного осветления;
  - iii. концентрируют образец со стадии (ii) с использованием однопроходной тангенциальной поточной фильтрации с получением концентрированного сбора;
  - iv. подвергают концентрированный сбор со стадии (iii) хроматографии на основе белка А для улавливания бевацизумаба и получения элюата, содержащего частично очищенный бевацизумаб;
  - v. подвергают элюат со стадии (iv) вирусной инактивации при низком рН с получением образца с инактивированными вирусами;
  - vi. подвергают образец с инактивированными вирусами со стадии (v) дальнейшей катионообменной хроматографии для дополнительной очистки с

получением элюата, содержащего в основном бевацизумаб высокой степени очистки;

vii. подвергают элюат со стадии (vi) анионообменной хроматографии для удаления следовых примесей, например, белков клетки-хозяина (HCP), ДНК клетки-хозяина (HCD), эндотоксинов;

viii. подвергают элюат со стадии (vii) фильтрации для снижения вирусной нагрузки и полного удаления вирусов;

ix. концентрируют и проводят диафильтрацию образца со стадии (viii) с получением бевацизумаба; и

x. составляют композицию бевацизумаба по настоящему изобретению из образца, полученного на стадии (ix).

3. Способ по п. 2, где вирусную инактивацию при низком pH проводят при pH в диапазоне от pH 3,0 до 5,0, предпочтительно, в диапазоне от 3,0 до 4,0, наиболее предпочтительно, в диапазоне от pH 3,5 до 4,0.

4. Способ по п. 2, где неподвижную фазу для катионообменной хроматографии выбирают из группы, включающей  $\text{SO}_3^-$  сульфоизобутил,  $\text{SO}_3^-$  сульфозтил, сульфопропил, карбоксиметил, предпочтительно, сульфонат, неподвижную фазу анионообменной хроматографии выбирают из группы, включающей диэтиламиноэтил, четвертичный амин, поликватерниум, N-бензил-N-метилэтаноламин, предпочтительно четвертичный амин, а диафильтрацию проводят в присутствии диафильтрационного буфера TFF-II.

5. Офтальмологическая композиция, полученная способом по п. 2,

a. где предельные значения при испытании на бактериальные эндотоксины (БЕТ) находятся в диапазоне от 0,001 до 0,4 ЕЭ/мг, предпочтительно в диапазоне от 0,001 до 0,2 ЕЭ/мг и, более предпочтительно, в диапазоне от 0,001 до 0,16 ЕЭ/мг;

b. где механические включения представляют собой:

i. от 1 до 50 частиц диаметром 10 мкм или более на мл,

ii. от 0 до 5 частиц диаметром 25 мкм или более на мл и

iii. от 0 до 2 частиц диаметром 50 мкм или более на мл;

c. где композиция содержит от 0,1 до 5%, более предпочтительно, от 0,1 до 4% и, наиболее предпочтительно, от 0,1 до 3,5% агрегата, в течение периода от

2 до 3 лет, предпочтительно, от 2 до 2,5 лет, наиболее предпочтительно, в течение 2 лет.

6. Офтальмологическая композиция по п. 1, где композиция содержит бевацизумаб, буфер, стабилизатор и поверхностно-активное вещество.

7. Офтальмологическая композиция по п. 6, где концентрация бевацизумаба в композиции находится в диапазоне от 24 мг/мл до 26 мг/мл, предпочтительно, в диапазоне от 25 мг/мл до 26 мг/мл, более предпочтительно, составляет 25 мг/мл.

8. Офтальмологическая композиция по п. 6, где буфер выбран из группы, включающей фосфатный, цитратный, ацетатный, гистидиновый, сукцинатный, глюконатный, глициновый буфер, более предпочтительно, фосфатный буфер, и имеет концентрацию от 40 мМ до 60 мМ, более предпочтительно, от 50 мМ до 60 мМ, а pH находится в диапазоне от 6,0 до 7,0, более предпочтительно, от 6,1 до 6,3.

9. Офтальмологическая композиция по п. 6, где стабилизатор представляет собой сахарид, выбранный из моносахарида, дисахарида, трисахарида, полисахарида, сахарного спирта, восстанавливающего сахара, невосстанавливающего сахара, предпочтительно, сахарид представляет собой глюкозу, сахарозу, трегалозу, лактозу, фруктозу, мальтозу, декстран, глицерин, декстран, эритрит, глицерин, арабит, силит, сорбит, маннит, мелибиозу, мелицитозу, рафинозу, маннотриозу, стахиозу, мальтозу, лактулозу, мальтулозу, глюцит, мальтит, лактит, изомальтулозу, более предпочтительно, трегалозу, и находится в диапазоне от 40 мг/мл до 70 мг/мл, предпочтительно, диапазон может составлять от 45 мг/мл до 65 мг/мл, более предпочтительно, в диапазоне от 50 мг/мл до 60 мг/мл.

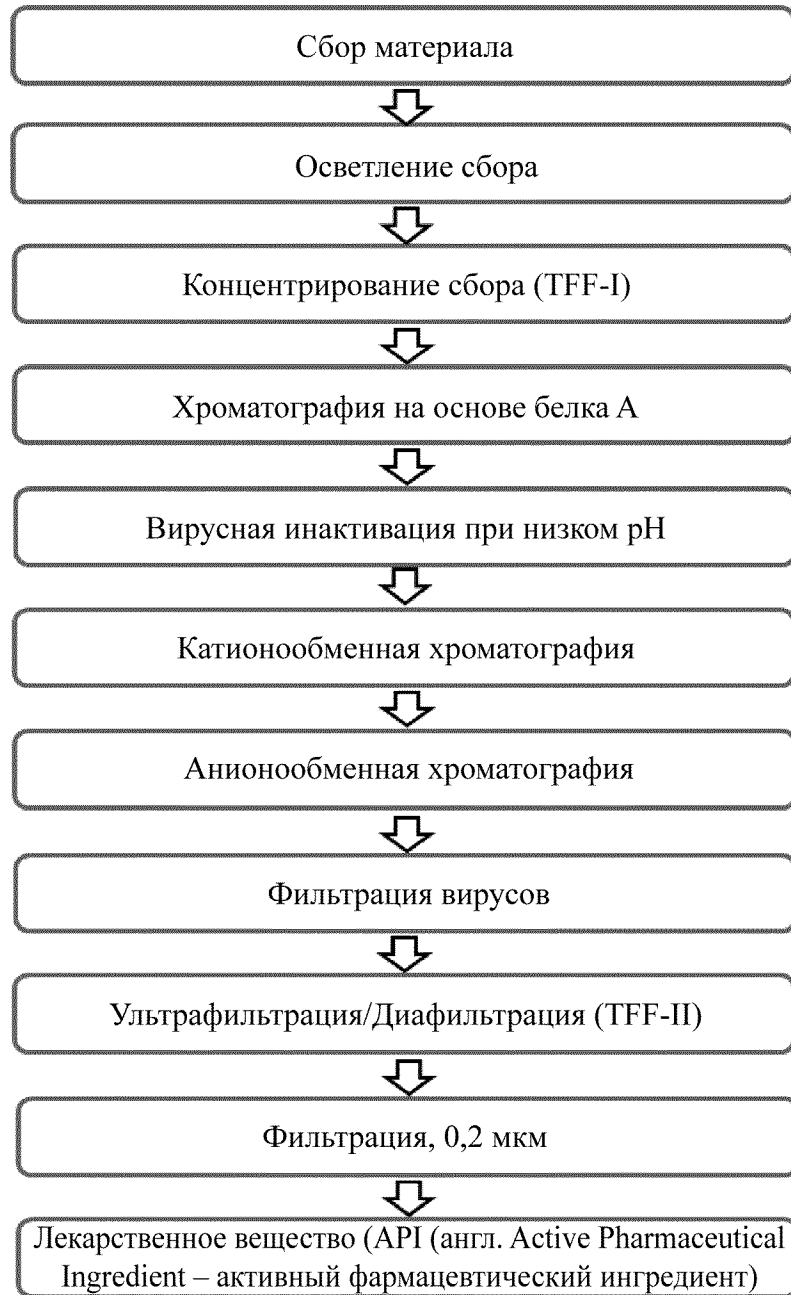
10. Офтальмологическая композиция по п. 6, где поверхностно-активное вещество выбрано из группы, включающей неионогенное поверхностно-активного вещество, предпочтительно, полисорбат, полисорбат 20 или полисорбат 80, более предпочтительно, полисорбат 20 и находится в диапазоне от 0,2 мг/мл до 0,6 мг/мл, предпочтительно, в диапазоне от 0,3 мг/мл до 0,5 мг/мл, более предпочтительно, в диапазоне от 0,35 мг/мл до 0,45 мг/мл.

11. Офтальмологическая композиция по п. 1, вводимая в виде заранее определенной дозы, в форме флакона, картриджа или ручки или предварительно заполненного шприца, предпочтительно, предварительно заполненного шприца, предпочтительно, одноразового предварительно заполненного шприца с объемом наполнения от 140 мкл до 200 мкл и дозой 50 мкл.

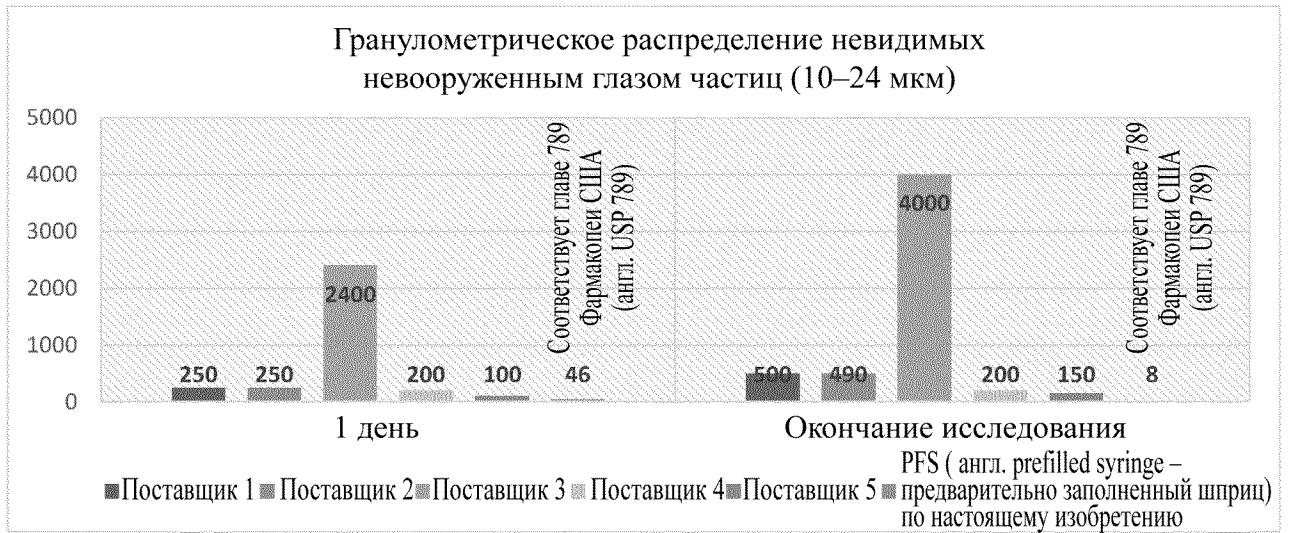
12. Предварительно заполненный шприц по п. 11, где инъекцию выполняют интравитреально.

13. Офтальмологическая композиция и предварительно заполненный шприц по п.п. 1, с 5 до 12 для применения при офтальмологических заболеваниях, выбранных из группы, включающей влажную форму возрастной макулярной дегенерации, хориоидальную неоваскуляризацию, ретинальную ангиоматозную пролиферацию, патологическую миопию, ангиоидные полосы сетчатки, болезнь Беста, ветелиформную дистрофию взрослых, центральную серозную хориоретинопатию, точечную внутреннюю хориоидопатию, мультифокальный хориоидит, синдром предполагаемого гистоплазмоза глаз, остеому хориоидеи, токсоплазмоз, увеит, ложную опухоль головного мозга, перипапиллярную идиопатическую неоваскуляризацию сетчатки, пролиферативную диабетическую ретинопатию, серповидно-клеточную ретинопатию, ретинопатию недоношенных, болезнь Илза, макулярный отек, диабетическую ретинопатию, окклюзию центральной вены сетчатки, окклюзию ветки вены сетчатки, псевдофакию, увеит, окклюзионный васкулит, пигментный ретинит, неоваскулярную глаукому, окклюзию центральной вены сетчатки, окклюзию ветки вены сетчатки, пролиферативную диабетическую ретинопатию, окклюзию центральной артерии сетчатки, глазной ишемический синдром, радиационно индуцированную, радиационную оптическую нейропатию, радиационную ретинопатию, рак молочной железы с метастазами в хориоидею, меланома-ассоциированную неоваскуляризацию, макронебризм, вазопротролиферативную опухоль, болезнь Коатса, юстапапиллярную капиллярную гемангиому, идиопатическую макулярную телеангиозктазию, полипообразную хориоидальную васкулопатию, центральную серозную хориоретинопатию, переднюю неартериитную ишемическую невропатию зрительного нерва, герпетическую неоваскуляризацию роговицы, рубцующуюся пемфигоидную неоваскуляризацию роговицы, неоваскуляризацию задней капсулы, неоваскуляризацию отторжения роговичного трансплантата, неоваскуляризацию, связанную с сухим глазом, ревизию фильтрационной подушки, дополнения к фильтрующей хирургии глаукомы, предпочтительно, влажную форму возрастной макулярной дегенерации.

14. Набор, содержащий офтальмологическую композицию по пп. 1, 5 - 13 в предварительно заполненном шприце, включающий предварительно заполненный шприц, иглу калибра от 29 до 34, инструкции по применению в блистерной упаковке.



**ФИГ. 1**



ФИГ. 2a



ФИГ. 2b