

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392707** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.12.21

(22) Дата подачи заявки
2022.04.27

(51) Int. Cl. *A61K 9/08* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/22 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ПЕМБРОЛИЗУМАБА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **2021112111**

(32) **2021.04.27**

(33) **RU**

(86) **PCT/RU2022/050140**

(87) **WO 2022/231481 2022.11.03**

(71) Заявитель:
**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"БИОКАД" (RU)**

(72) Изобретатель:

**Костандян Алина Александровна,
Андреева Анастасия Алексеевна,
Ломкова Екатерина Александровна,
Яковлев Александр Олегович,
Морозов Дмитрий Валентинович (RU)**

(74) Представитель:
Мельчаева О.А. (RU)

(57) Изобретение относится к области фармации и медицины, а именно к фармацевтическим композициям анти-PD-1 антитела пембролизумаба, которые могут быть водными или лиофилизированными. Дополнительно изобретение относится к применению указанных композиций для лечения злокачественных новообразований или инфекционных заболеваний, а также к применению указанных композиций для получения лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования или инфекционного заболевания.

A1

202392707

202392707

A1

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ПЕМБРОЛИЗУМАБА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области фармации и медицины, а именно к фармацевтическим композициям анти-PD-1 антитела пембролизумаба, которые могут быть использованы для лечения злокачественных новообразований или инфекционных заболеваний.

Уровень техники

Белок программируемой смерти 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) является ингибиторным членом семейства рецепторов CD28 и расположен на клеточной поверхности Т-лимфоцитов, В-клеток, моноцитов, НК и дендритных клеток (Jin H.T., Ahmed R., Okazaki T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011; 350: 17-37). PD-1 является трансмембранным рецептором из семейства иммуноглобулинов и состоит из 288 аминокислот. Структура белка включает в себя внеклеточный домен IgV, «ножку», трансмембранный домен и цитоплазматический домен. Последний включает в себя 2 тирозин-содержащие последовательности (ITIM и ITSM), участвующие в передаче сигнала внутри клетки (Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2010;236:219-242. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x).

PD-1 имеет 2 ингибиторных лиганда, PD-L1 и PD-L2, которые также являются трансмембранными рецепторами и играют важную роль в иммунном гомеостазе. PD-L1 экспрессируется на Т- и В-лимфоцитах, дендритных клетках, макрофагах, эндотелиальных, гемопоэтических и эпителиальных клетках. Кроме того, экспрессия PD-L1 была обнаружена на клетках многих типов злокачественных опухолей, таких как меланома, почечно-клеточный рак, немелкоклеточный рак легкого, опухоли головы и шеи, опухоли желудочно-кишечного тракта, рак яичника, лимфомы, лейкозы (Han Y., Liu D., Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res.* 2020; 10(3): 727-742). PD-L2 имеет ограниченную экспрессию на активированных

макрофагах и дендритных клетках и связывается главным образом с PD-1 рецептором. Главным фактором, увеличивающим экспрессию PD-L1 и PD-L2, является противовоспалительный цитокин IFN γ .

Рецептор PD-1 и его лиганд PD-L1 играют значительную роль в выживании и прогрессировании злокачественных новообразований. Как было отмечено выше, экспрессия рецептора PD-L1 повышена на поверхности многих типов злокачественных клеток. Взаимодействие PD-L1 с PD-1 способствует развитию иммуносупрессии в микроокружении опухоли, и, таким образом, защищает клетки опухоли от действия цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов. Система PD-1/PD-L1 является перспективной терапевтической мишенью (Wu Y., Chen W., Xu Z.P., Gu W. PD-L1 Distribution and Perspective for Cancer Immunotherapy-Blockade, Knockdown, or Inhibition. *Front Immunol.* 2019; 10: 2022, Ju X., Zhang H., Zhou Z., Wang Q. Regulation of PD-L1 expression in cancer and clinical implications in immunotherapy. *Am J Cancer Res.* 2020; 10(1): 1-11).

Известно анти-PD-1 антитело – пембролизумаб, которое является гуманизированным моноклональным антителом класса G4 (IgG4) к человеческому рецептору PD-1 (PCT/US2008/007463). Получен комбинацией переменных последовательностей мышиного высокоаффинного антитела к рецептору PD-1 и каркаса человеческого IgG4 каркаса, содержащего стабилизирующую мутацию S228P в Fc фрагменте. Он избирательно блокирует связывание рецептора PD-1 с его лигандами, реактивируя противоопухолевый иммунитет. Активация иммунного ответа способствует элиминации опухолевых клеток.

Пембролизумаб показал высокую эффективность в лечении различных видов злокачественных опухолей: меланома, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи, классическая лимфома Ходжкина, уротелиальная карцинома, рак желудка, злокачественные новообразования с высоким уровнем микросателитной нестабильности, гепатоцеллюлярная карцинома, рак пищевода, рак шейки матки, карцинома

Меркеля, почечно-клеточный рак, рак эндометрия и т. д. Также известно о применении пембролизумаба для лечения инфекционных заболеваний. В настоящее время продолжается активное исследование пембролизумаба в терапии других заболеваний или нарушений, при которых ингибирование активности PD-1 может быть целесообразным.

Из уровня техники известен препарат Китруда (Keytruda), в состав которого входят пембролизумаб, сахароза, полисорбат 80 и гистидиновый буфер (PCT/US2012/031063). Несмотря на это, по-прежнему существует потребность в новых улучшенных стабильных фармацевтических композициях пембролизумаба.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 представляет собой график зависимости содержания агрегатов, определенных методом Э ВЭЖХ (%), от времени хранения при температуре 25 ± 2 °С для моноклонального антитела пембролизумаба в исследуемых составах.

Фигура 2 представляет собой график зависимости содержания мономера, определенных методом Э ВЭЖХ (%), от времени хранения при температуре 25 ± 2 °С для моноклонального антитела пембролизумаба в исследуемых составах.

Фигура 3 представляет собой график зависимости содержания основной фракции, определенных методом ИО ВЭЖХ (%), от времени хранения при температуре 25 ± 2 °С для моноклонального антитела пембролизумаба в исследуемых составах.

Фигура 4 представляет собой график зависимости содержания мономера, определенных методом КЭФ в нередуцирующих условиях (%), от времени хранения при температуре 25 ± 2 °С для моноклонального антитела пембролизумаба в исследуемых составах.

Фигура 5 представляет собой график зависимости содержания суммы легкой и тяжелой цепи, определенных методом КЭФ в редуцирующих

условиях (%), от времени хранения при температуре 25 ± 2 °С для моноклонального антитела пембролизумаба в исследуемых составах.

Фигура 6 представляет собой график зависимости относительной специфической активности (%) от времени хранения при температуре 25 ± 2 °С для моноклонального антитела пембролизумаба в исследуемых составах.

Подробное описание изобретения

Определения

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе.

В настоящем описании и в последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, слова «иметь», «включать» и «содержать» или их вариации, такие как «имеет», «имеющий», «включает», «включающий», «содержит» или «содержащий», следует понимать, как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции и/или составу, содержащему пембролизумаб в терапевтически эффективном количестве и эксципиенты или вспомогательные вещества (носители, разбавители, наполнители, растворители и т. п.), выбор и соотношение которых зависит от их природы, способа назначения и дозировки.

Термин «водная композиция» при использовании в данном документе относится к композиции на основе воды, в качестве воды могут быть

использованы: вода, вода для инъекций, физиологический раствор (0,9-1,0%-ный водный раствор хлористого натрия).

Термин «лиофилизированный», используемый в настоящем документе, относится к препарату, который был подвергнут процессу, известному в данной области техники как сушка из замороженного состояния, включающему в себя замораживание препарата и последующее удаление льда из замороженного содержимого.

Фармацевтическая композиция является «стабильной», если активный агент сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность в течение заявленного срока годности при температуре хранения, например, при 2-8 °С. При этом активный агент может сохранять и физическую, и химическую стабильность, и биологическую активность. Период хранения выбирается на основании результатов исследования стабильности при ускоренном и естественном хранении.

Термин «длительное хранение» или «долговременная стабильность» следует понимать, как обозначение того, что фармацевтическая композиция может храниться в течение трех месяцев или более, в течение шести месяцев или более, в течение одного года или более, а также композиция может быть с минимальным сроком хранения в стабильном состоянии по меньшей мере два года. В общем, термины «длительное хранение» и «долговременная стабильность» дополнительно включают продолжительности хранения в стабильном состоянии, которые по меньшей мере сравнимы или лучше, чем срок хранения в стабильном состоянии, как правило, необходимый для доступных в настоящее время коммерческих составов антитела к PD-1 пембролизумаба без потерь в стабильности, которые могут сделать состав непригодным для определенного для него фармацевтического применения.

Термин «буферный агент» относится к кислотному или щелочному компоненту (обычно слабой кислоте или слабому основанию) буфера или буферного раствора. Буферный агент помогает поддерживать значение pH

данного раствора при или около заранее определенного значения, и буферные агенты обычно выбирают для дополнения заранее определенного значения. Буферный агент может представлять собой единственное соединение, которое приводит к желательному буферному эффекту, в особенности, если указанный буферный агент смешан с (и подходяще способен к протонному обмену с) подходящим количеством (в зависимости от заранее определенного желательного значения) его соответствующего «кислотного/щелочного конъюгата».

Термин «буфер» или «буферный раствор» относится к водному раствору, содержащему смесь кислоты (обычно слабой кислоты, такой как, например, уксусная кислота, лимонная кислота) и ее конъюгированного основания (такой как, например, ацетатной или цитратной соли, например, ацетат натрия, цитрат натрия, а также гидраты указанных солей, например, натрия ацетат тригидрат) или альтернативно смесь основания (обычно слабого основания, например, гистидина) и его конъюгированной кислоты (например, гистидина гидрохлорида или гистидина гидрохлорида моногидрата, или L-гистидина гидрохлорида (г/х) моногидрата (м/г), или L-гистидина г/х м/г, или гистидина г/х м/г). Значение pH «буферного раствора» мало изменяется при добавлении к нему небольшого количества сильного основания или сильной кислоты, а также при разбавлении и концентрировании, благодаря «буферному эффекту», обеспечиваемому «буферным агентом».

В настоящей заявке «буферная система» содержит один или несколько буферных агентов и/или их конъюгата(ов) с кислотой или основанием, и более подходяще содержит один или несколько буферных агентов и их конъюгата(ов) с кислотой или основанием, и наиболее подходяще содержит только один буферный агент и его кислотный/щелочной конъюгат. Если не указано иное, любые концентрации, указанные в настоящем изобретении по отношению к «буферной системе» (концентрация буфера) могут относиться к объединенной концентрации буферного(ых) агента(ов) и/или его конъюгата(ов) с кислотой или основанием. Другими словами, концентрации,

указанные в настоящей заявке по отношению к «буферной системе», могут относиться к объединенной концентрации релевантных буферных видов (то есть, видов в динамическом равновесии друг с другом, например, цитрат/лимонная кислота). Суммарное значение рН композиции, содержащей релевантную буферную систему, является отображением равновесной концентрации каждого из релевантных буферных видов (то есть, баланса буферного (ых) агента (ов) с его конъюгатом (ами) с кислотой или основанием).

В качестве буферных растворов могут быть использованы, например, ацетатный, фосфатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный и другие. В общем случае, преимущественными являются значения рН фармацевтической композиции от 4,0 до 8,0.

Под «стабилизатором» понимается вспомогательное вещество или смесь двух и более вспомогательных веществ, которые обеспечивают физическую и/или химическую стабильность активного вещества. В качестве стабилизаторов могут быть использованы аминокислоты, например, аргинин, гистидин, глицин, лизин, глутамин, пролин, но, не ограничиваясь ими; поверхностно-активные вещества, например, полисорбат 20 (торговое наименование Tween 20), полисорбат 80 (торговое наименование Tween 80), полиэтилен-полипропилен гликоль и его кополимеры (торговые наименования Поллоксамер (Poloxamer), Плуроник (Pluronic)), натрия додецилсульфат (SDS), но, не ограничиваясь ими; антиоксиданты, например, метионин, ацетилцистеин, аскорбиновая кислота, монотиоглицерол, соли серистых кислот, и т.п., но не ограничиваясь ими; хелатирующие агенты, например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА), цитрат натрия и т.п., но не ограничиваясь ими.

Термины «осмотический агент» или «агент, регулирующий тоничность», а также «осмолитик» в том виде, как они здесь использованы, относятся к эксципиенту, который может обеспечивать требуемое

осмотическое давление жидкого раствора антитела. В некоторых воплощениях агент, регулирующий тоничность, может подводить осмотическое давление жидкого препарата антитела до изотоничного так, что данный препарат антитела является физиологически совместимым с клетками ткани организма субъекта. В еще одном воплощении «агент, регулирующий тоничность», может способствовать увеличению стабильности антител. «Изотоничный» препарат представляет собой препарат, который имеет осмотическое давление, эквивалентное человеческой крови. Изотоничные препараты обычно имеют осмотическое давление от примерно 239 до 376 мОсм/кг. Агент, регулирующий тоничность, может находиться в энантиомерной (например, L- или D-энантиомер) или рацемической форме; в форме изомеров, таких как альфа или бета, включая альфа, альфа; или бета, бета; или альфа, бета; или бета, альфа; в форме свободной кислоты или свободного основания; в форме соли; в гидратированной форме (например, моногидрат или дигидрат) или в безводной форме. Примерами осмотических агентов являются, но не ограничиваются ими, сахара (трегалоза, трегалозы дигидрат, сахароза, глюкоза), полиолы (маннит (или маннитол), сорбит (или сорбитол)), аминокислоты (пролин или L-пролин, аргинин, глицин), или соли (натрия хлорид, калия хлорид, магния хлорид).

Термин «солубилизатор» при использовании в данном тексте означает фармацевтически приемлемое неионногенное поверхностно-активное вещество. Можно использовать один солубилизатор, а также комбинации солубилизаторов. Примерами солубилизаторов являются, но не ограничиваются ими, полисорбат 20 или полисорбат 80, полуксамер 184 или полуксамер 188, или PLURONIC®.

Как правило, аминокислоты представляют собой L-аминокислоты. Например, если используют гистидин и гистидина гидрохлорид моногидрат, как правило, это L-гистидин и L-гистидина гидрохлорид моногидрат. Например, если используют пролин, то как правило, это L-пролин. Можно

также использовать эквиваленты аминокислот, например, фармацевтически приемлемые соли пролина (например, пролина гидрохлорид).

Термин «лекарственное средство» или «препарат» подразумевает вещество (или смесь веществ в виде фармацевтической композиции) в виде таблеток, капсул, растворов, мазей и др. готовых форм, предназначенное для восстановления, исправления или изменения физиологических функций у человека и животных, а также для лечения и профилактики болезней, диагностики, анестезии, контрацепции, косметологии и прочего.

Термин «применение» относится к возможности применения фармацевтической композиции пембролизумаба согласно изобретению для лечения, облегчения течения заболеваний, для ускорения ремиссии, снижения частоты рецидивов заболеваний или нарушений.

Термин «способ лечения» относится к возможности применения фармацевтической композиции пембролизумаба согласно изобретению для лечения, облегчения течения заболеваний, для ускорения ремиссии, снижения частоты рецидивов заболеваний или нарушений. «Лечить» или «лечение», «профилактика» заболевания, нарушения или состояния может включать предотвращение или замедление появления клинических симптомов заболевания, нарушения или состояния, развивающегося у человека, ингибирования заболевания, нарушения или состояния, то есть остановки, уменьшения или замедления развития заболевания или его рецидива (в случае поддерживающей терапии) или по меньшей мере его одного клинического или субклинического симптома, или облегчение или ослабление заболевания, то есть вызывание регресса заболевания, нарушения или состояния.

Термин «парентеральное введение» означает режимы введения, обычно выполняемые с помощью инъекции (инфузии), и включает, в частности, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутритрахеальную, внутрикапсулярную, внутриорбитальную, внутрикардиальную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную,

внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, эпидуральную и надчревную инъекцию или инфузию.

Сокращения

IC – входной контроль (incoming control),

FT – замораживание и размораживание (freeze-thaw),

k_D – параметр диффузионного взаимодействия,

Rh – гидродинамический радиус,

SH – шейкирование (shake),

T – температура,

T нач – температура начала плавления,

T1 – первая температура плавления,

T2 – вторая температура плавления,

T агр – температура агрегации,

TS – термостресс (thermal stress),

TS50 96Н – показатель качества после термического воздействия при 50°C в течение 96 часов,

Δ TS50 96Н – изменение показателя качества после стресс-воздействия (термическое воздействие при 50°C в течение 96 часов),

TS50 – показатель качества после термического воздействия при 50°C в течение 10 дней,

Δ TS50 – изменение показателя качества после стресс-воздействия (термическое воздействие при 50°C в течение 10 дней),

Δ abs – абсолютное изменение профиля заряженных форм, рассчитанное методом 21,

SH800 96Н – показатель качества после перемешивания (shake) в течение 96 часов,

Δ SH800 96Н – изменение показателя качества после стресс-воздействия (перемешивание (shake) в течение 96 часов),

SH800 – показатель качества после перемешивания (shake) в течение 14 дней,

Δ SH800 – изменение показателя качества после стресс-воздействия (перемешивание (shake) в течение 14 дней),

FT(-20)*5 – показатель качества после 5 циклов замораживания,

FT(-20)*3 – показатель качества после 3 циклов замораживания,

Δ FT(-20)*5 – изменение показателя качества после стресс-воздействия (5 циклов замораживания),

Δ FT(-20)*3 – изменение показателя качества после стресс-воздействия (3 цикла замораживания),

Acid 3.5 1H – показатель качества после кислого гидролиза до pH 3,5 и выдерживании в течение 1 часа,

Acid 4.0 – показатель качества после кислого гидролиза до pH 4,0 и выдерживании в течение 10 дней,

Δ Acid 3.5 1H – изменение показателя качества после стресс-воздействия (кислотный гидролиз до pH 3,5 и выдерживание в течение 1 часа),

Δ Acid 4.0 – изменение показателя качества после стресс-воздействия (кислотный гидролиз до pH 4,0 и выдерживание в течение 10 дней),

Basic 8.5 1H – показатель качества после щелочного гидролиза до pH 8,5 и выдерживании в течение 1 часа,

Basic 8.0 – показатель качества после щелочного гидролиза до pH 8,0 и выдерживании в течение 10 дней,

Δ Basic 8.5 1H – изменение показателя качества после стресс-воздействия (щелочной гидролиз до pH 8,5 и выдерживании в течение 1 часа),

Δ Basic 8.0 – изменение показателя качества после стресс-воздействия (щелочной гидролиз до pH 8,0 и выдерживание в течение 10 дней),

Ox 0,1% – показатель качества после окисления пероксидом водорода в течение 4 часов,

Δ Ox 0,1% – изменение показателя качества после стресс-воздействия (окисление пероксидом водорода в течение 4 часов),

UV – показатель качества после фотовоздействия, доза ICH×1,
Δ UV – изменение показателя качества после стресс-воздействия
(фотовоздействие, доза ICH×1),
n/a – не определяли,
UV – УФ-облучение,
ИО ВЭЖХ – ионообменная высокоэффективная жидкостная
хроматография,
КЭФ – капиллярный электрофорез,
Неред. – нередуцирующие условия,
ПО – программное обеспечение,
Ред. – редуцирующие условия,
СА – специфическая активность (potency),
Э ВЭЖХ – эксклюзионная высокоэффективная жидкостная
хроматография.

В настоящем изобретении раскрыты фармацевтические композиции анти-PD-1 антитела пембролизумаба, которые могут быть использованы в качестве лекарственного средства для лечения злокачественных новообразований или инфекционных заболеваний.

При выборе состава учитывались назначение, способ применения и переносимость препарата (например, уменьшение дискомфорта при введении), а также обеспечение стабильности и сохранение активности белковой молекулы в составе препарата.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей:

- (i) пембролизумаб;
- (ii) гистидин;
- (iii) гистидина гидрохлорида моногидрат;
- (iv) глицин;
- (v) трегалозу и полоксамер 188, или

пролин; и

(vi) воду для инъекций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит:

(i) пембролизумаб;

(ii) гистидин;

(iii) гистидина гидрохлорида моногидрат;

(iv) глицин;

(v) трегалозу и полксамер 188; и

(vi) воду для инъекций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит:

(i) пембролизумаб;

(ii) гистидин;

(iii) гистидина гидрохлорида моногидрат;

(iv) глицин;

(v) пролин; и

(vi) воду для инъекций.

Концентрация пембролизумаба, содержащегося в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, может варьироваться в зависимости от желаемых свойств композиций, а также от конкретных условий, способов и целей использования фармацевтических композиций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пембролизумаб находится в концентрации 5-50 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гистидин находится в концентрации 0,087-0,432 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гистидина гидрохлорида моногидрат находится в концентрации 0,464-0,931 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения глицин находится в концентрации 1-2 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения трегалоза находится в концентрации 70-130 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полуксамер 188 находится в концентрации 0,8-1,2 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пролин находится в концентрации 20-34 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит:

- (i) 5-50 мг/мл пембролизумаба;
- (ii) 0,087-0,432 мг/мл гистидина;
- (iii) 0,464-0,931 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
- (iv) 1-2 мг/мл глицина;
- (v) 70-130 мг/мл трегалозы и 0,8-1,2 мг/мл полуксамера 188, или 20-34 мг/мл пролина; и
- (vi) воду для инъекций до 1 мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит:

- (i) 5-50 мг/мл пембролизумаба;
- (ii) 0,087-0,432 мг/мл гистидина;
- (iii) 0,464-0,931 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
- (iv) 1-2 мг/мл глицина;
- (v) 70-130 мг/мл трегалозы и 0,8-1,2 мг/мл полуксамера 188; и
- (vi) воду для инъекций до 1 мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит:

- (i) 5-50 мг/мл пембролизумаба;
- (ii) 0,087-0,432 мг/мл гистидина;
- (iii) 0,464-0,931 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
- (iv) 1-2 мг/мл глицина;
- (v) 20-34 мг/мл пролина; и

(vi) воду для инъекций до 1 мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пембролизумаб находится в концентрации 15-35 мг/мл, или 20-30 мг/мл, или 25 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гистидин находится в концентрации 0,200-0,319 мг/мл, или 0,200-0,250 мг/мл, или 0,210-0,240 мг/мл, или 0,210-230 мг/мл, или 0,215-0,230 мг/мл, или 0,215-0,225 мг/мл, или 0,220-0,225 мг/мл, или 0,221 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гистидин является L-гистидином.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гистидина гидрохлорид моногидрат находится в концентрации 0,600-0,900 мг/мл или 0,650-0,850 мг/мл, или 0,700-0,800 мг/мл, или 0,730-0,770 мг/мл, или 0,750 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гистидина гидрохлорид моногидрат является L-гистидина гидрохлорида моногидратом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения глицин находится в концентрации 1,3-1,7 мг/мл, 1,4-1,6 мг/мл, или 1,5 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения трегалоза находится в концентрации 70-100 мг/мл, или 70-90 мг/мл, или 70-85 мг/мл, или 75-85 мг/мл, или 80 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения трегалоза является трегалозы дигидратом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полоксамер 188 находится в концентрации 0,9-1,1 мг/мл, или 0,95-1,05 мг/мл, или 1,0 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пролин находится в концентрации 22-32 мг/мл, или 24-30 мг/мл, или 27 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пролин является L-пролином.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция имеет рН 5,1-6,1, 5,2-6,0, 5,3-5,9, 5,4-5,8 или 5,5-5,7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция имеет рН 5,6.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит:

- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
 - (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
 - (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1,5 мг/мл глицина;
 - (v) 80 мг/мл трегалозы и 1,0 мг/мл полоксамера 188, или 27 мг/мл пролина;
 - (vi) воду для инъекций до 1 мл; и
- где композиция имеет рН 5,5 – 5,7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит:

- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
 - (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
 - (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1,5 мг/мл глицина;
 - (v) 80 мг/мл трегалозы и 1,0 мг/мл полоксамера 188;
 - (vi) воду для инъекций до 1 мл; и
- где композиция имеет рН 5,5 – 5,7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит:

- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
 - (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
 - (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1,5 мг/мл глицина;
 - (v) 80 мг/мл трегалозы дигидрата и 1,0 мг/мл полоксамера 188;
 - (vi) воду для инъекций до 1 мл; и
- где композиция имеет рН 5,5 – 5,7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит:

- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
 - (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
 - (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1,5 мг/мл глицина;
 - (v) 27 мг/мл пролина;
 - (vi) воду для инъекций до 1 мл; и
- где композиция имеет рН 5,5 – 5,7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция имеет рН 5,6.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции пембролизумаба, представленной в сухой форме, то есть в форме порошка или гранул для растворения в подходящем растворителе (например, воде) перед введением. Такое лекарственное средство может быть получено, например, с помощью лиофилизации, т. е. процесса, известного в данной области техники как сушка из замороженного состояния, включающая в себя замораживание препарата и последующее удаление растворителя из замороженного содержимого.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции пембролизумаба, полученной лиофилизацией любой фармацевтической композиции пембролизумаба, описанной выше. Таким образом фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть как водными, так и лиофилизированными (лиофилизаты).

Лиофилизаты используют для получения других лекарственных форм. Например, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий. Лиофилизаты восстанавливают путем растворения в подходящем растворителе, чаще всего в воде для инъекций. Также лиофилизированные композиции восстанавливают сначала в необходимом объеме растворителя

(чаще всего в воде), а затем дополнительно разводят в подходящем растворителе (например, 5% раствор глюкозы, 0,9% раствор хлорида натрия).

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция пембролизумаба получена лиофилизацией фармацевтической композиции пембролизумаба по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция пембролизумаба получена лиофилизацией фармацевтической композиции пембролизумаба, содержащей:

- (i) 5-50 мг/мл пембролизумаба;
- (ii) 0,087-0,432 мг/мл гистидина;
- (iii) 0,464-0,931 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
- (iv) 1-2 мг/мл глицина;
- (v) 70-130 мг/мл трегалозы и 0,8-1,2 мг/мл полоксамера 188, или 20-34 мг/мл пролина; и
- (vi) воду для инъекций до 1 мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция пембролизумаба получена лиофилизацией фармацевтической композиции пембролизумаба, содержащей:

- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
 - (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
 - (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1,5 мг/мл глицина;
 - (v) 80 мг/мл трегалозы и 1,0 мг/мл полоксамера 188;
 - (vi) воду для инъекций до 1 мл; и
- где композиция имеет рН 5,5 – 5,7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция пембролизумаба получена лиофилизацией фармацевтической композиции пембролизумаба, содержащей:

- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
- (ii) 0,221 мг/мл гистидина;

- (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1,5 мг/мл глицина;
 - (v) 80 мг/мл трегалозы дигидрата и 1,0 мг/мл полоксамера 188;
 - (vi) воду для инъекций до 1 мл; и
- где композиция имеет рН 5,5 – 5,7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция пембролизумаба получена лиофилизацией фармацевтической композиции пембролизумаба, содержащей:

- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
 - (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
 - (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1,5 мг/мл глицина;
 - (v) 27 мг/мл пролина;
 - (vi) воду для инъекций до 1 мл; и
- где композиция имеет рН 5,5 – 5,7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция пембролизумаба, из которой получают лиофилизированную композицию, имеет рН 5,6.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции пембролизумаба, описанной выше, для лечения злокачественного новообразования или инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к применению фармацевтической композиции пембролизумаба, содержащей:

- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
 - (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
 - (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1,5 мг/мл глицина;
 - (v) 80 мг/мл трегалозы и 1,0 мг/мл полоксамера 188;
 - (vi) воду для инъекций до 1 мл; и
- где композиция имеет рН 5,5 – 5,7,

для лечения злокачественного новообразования или инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к применению фармацевтической композиции пембролизумаба, содержащей:

- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
 - (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
 - (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1,5 мг/мл глицина;
 - (v) 80 мг/мл трегалозы дигидрата и 1,0 мг/мл полоксамера 188;
 - (vi) воду для инъекций до 1 мл; и
- где композиция имеет рН 5,5 – 5,7,

для лечения злокачественного новообразования или инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к применению фармацевтической композиции пембролизумаба, содержащей:

- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
 - (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
 - (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1,5 мг/мл глицина;
 - (v) 27 мг/мл пролина;
 - (vi) воду для инъекций до 1 мл; и
- где композиция имеет рН 5,5 – 5,7,

для лечения злокачественного новообразования или инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция пембролизумаба имеет рН 5,6.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к применению фармацевтической композиции пембролизумаба, полученной лиофилизацией указанной выше фармацевтической композиции

пембролизумаба, для лечения злокачественного новообразования или инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к применению фармацевтической композиции пембролизумаба, полученной лиофилизацией фармацевтической композиции пембролизумаба, содержащей:

- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
- (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
- (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
- (iv) 1,5 мг/мл глицина;
- (v) 80 мг/мл трегалозы и 1,0 мг/мл полоксамера 188;
- (vi) воду для инъекций до 1 мл; и

где композиция имеет рН 5,5 – 5,7,

для лечения злокачественного новообразования или инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к применению фармацевтической композиции пембролизумаба, полученной лиофилизацией фармацевтической композиции пембролизумаба, содержащей:

- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
- (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
- (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
- (iv) 1,5 мг/мл глицина;
- (v) 80 мг/мл трегалозы дигидрата и 1,0 мг/мл полоксамера 188;
- (vi) воду для инъекций до 1 мл; и

где композиция имеет рН 5,5 – 5,7,

для лечения злокачественного новообразования или инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к применению фармацевтической композиции пембролизумаба, полученной

лиофилизацией фармацевтической композиции пембролизумаба, содержащей:

- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
- (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
- (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
- (iv) 1,5 мг/мл глицина;
- (v) 27 мг/мл пролина;
- (vi) воду для инъекций до 1 мл; и

где композиция имеет рН 5,5 – 5,7,

для лечения злокачественного новообразования или инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция пембролизумаба, из которой получают лиофилизированную композицию, имеет рН 5,6.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции пембролизумаба, описанной выше, для получения лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования или инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления изобретения злокачественное новообразование выбрано из группы: меланомы, мелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи, первичная медиастинальная В-клеточная крупноклеточная лимфома, уротелиальный рак, рак желудка, злокачественное новообразование с высоким уровнем микросателлитной нестабильности или с дефицитом белков системы репарации ДНК (MMR), гепатоцеллюлярный рак, рак шейки матки, карцинома Меркеля, почечно-клеточный рак, рак эндометрия, рак пищевода, плоскоклеточный рак кожи, базально-клеточный рак, рак молочной железы, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак желчного пузыря, злокачественная

опухоль головного мозга, глиобластома, опухоль с высокой мутационной нагрузкой.

Инфекционное заболевание может быть вызвано вирусной, бактериальной или грибковой инфекцией. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекционное заболевание может быть вызвано, например, вирусом иммунодефицита человека, вирусом гепатита А, вирусом гепатита В, вирусом гепатита С, вирусом папилломы человека, вирусом Эпштейна-Барра, цитомегаловирусом человека и вирусом герпеса. Многие из указанных заболеваний могут быть хроническими.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная фармацевтическая композиция пембролизумаба по настоящему изобретению предназначена для парентерального введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная фармацевтическая композиция пембролизумаба по настоящему изобретению предназначена для внутримышечного, внутривенного или подкожного введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная фармацевтическая композиция пембролизумаба по настоящему изобретению может быть введена внутривенно в виде инфузии.

Фармацевтическая композиция пембролизумаба по настоящему изобретению может быть использована после разведения. Для этого необходимое количество композиции из флакона переносят в ёмкость для инфузий, содержащую стерильный 0,9% раствор натрия хлорида или стерильный 5% раствор декстрозы. Приготовленный раствор перемешивают путем осторожного переворачивания емкости для инфузий.

Терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции пембролизумаба по настоящему изобретению зависит от состояния субъекта, подлежащего лечению, тяжести состояния, предшествующей терапии и истории болезни, и ответу на терапевтическое средство. Подходящую дозу

можно регулировать по решению лечащего врача так, что ее можно вводить пациенту один раз или посредством нескольких введений.

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект лечения или пациент является млекопитающим, предпочтительно человеческим субъектом. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно хранить в любом подходящем для этого сосуде. Например, стеклянный или полимерный контейнер, флакон, ампула, шприц, картридж или бутылка необходимого объема. Сосуды могут снабжаться дополнительными средствами для введения, например капельницы, автоинжекторы.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может изготавливаться, упаковываться или широко продаваться в виде единичной стандартной дозы или множества единичных стандартных доз в виде готовой лекарственной формы. Используемый в данном документе термин «единичная стандартная доза» означает дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозировке активного ингредиента, который будет вводиться субъекту, или удобной части такой дозировки, например, половине или трети такой дозировки.

Фармацевтические композиции можно вводить в виде одного терапевтического средства или в комбинации с дополнительными терапевтическими средствами по мере необходимости. Таким образом, в одном варианте осуществления предлагаемые способы лечения и/или профилактики используют в комбинации с введением терапевтически эффективного количества другого активного средства. Другое активное средство можно вводить до, в течение или после введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Другое активное средство можно вводить как часть предлагаемой композиции или, альтернативно, в виде отдельного состава.

Примеры

Методики

1. Получение образцов пемболизумаба.

Получение образцов антитела с концентрацией 5-50 мг/мл осуществляли в концентрационных ячейках Stirred Cell (Millipore) под давлением. Для этого антитело в исходном составе помещали в ячейку, при непрерывном перемешивании белок концентрировали под потоком сжатого воздуха до необходимой концентрации, после чего поэтапно вносили в ячейку не менее чем 10 кратный объем водного раствора с целевым составом, включающим буферные, осмотические агенты и, если необходимо, дополнительные водорастворимые стабилизаторы. По завершении процесса диафильтрации антитела продолжали концентрирование до концентрации, превышающей целевую, выгружали из ячейки, определяли точную концентрацию белка методом УФ-спектрофотометрии. Затем к образцу вносили концентрат полксамера 188 и соответствующий раствор вспомогательных веществ для получения раствора с целевой концентрацией белка.

Получение образцов белка с концентрацией более 20 мг/мл проводили в кассетах Pellicon (Millipore) в режиме тангенциального потока. Для этого антитело в исходном составе помещали в емкость для диафильтрации, концентрировали белок до требуемой концентрации, после чего к системе подключали подачу не менее чем 10 кратного объема раствора с целевым составом, содержащим буферные агенты и, если необходимо, дополнительные водорастворимые стабилизаторы. По завершении процесса диафильтрации продолжали концентрирование до концентрации, превышающей целевую, выгружали из системы и определяли точную концентрацию белка. Затем к образцу вносили концентрат полксамера 188 и соответствующий раствор вспомогательных веществ для получения раствора с целевой концентрацией белка.

При получении составов, содержащих солюбилизаторы, например, полксамер 188, концентраты поверхностно-активных веществ, вносили к

антителу после завершения диафильтрации и концентрирования при финальном разведении антитела раствором вспомогательных веществ до целевой концентрации.

При асептическом наполнении в конечный контейнер (например, стерильный стеклянный или полимерный сосуд, флакон или шприц) раствор антитела фильтровали через стерилизующую мембрану с размером пор 0,22 мкм.

2. Определение концентрации белка в исследуемых образцах.

Концентрацию белка определяли с помощью метода УФ-спектрофотометрии при длине волны 280 нм в УФ-прозрачных планшетах.

Каждый образец разводили соответствующим раствором вспомогательных веществ до концентрации ~ 0,5 мг/мл. В лунку планшета для УФ-спектрофотометрии помещали 150 мкл разведенного образца. Измеряли оптическую плотность помещенных в планшет растворов на планшетном спектрофотометре при длине волны 280 нм. В качестве раствора сравнения использовали соответствующий раствор вспомогательных веществ.

Концентрацию белка (С) в мг/мл рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{A(280) \cdot b}{\varepsilon \cdot l}, \text{ где}$$

A_{280} – значение оптической плотности при длине волны 280 нм;

ε – коэффициент экстинкции исследуемого белка;

b – суммарный коэффициент разведения образца;

l – толщина слоя в лунке планшета; для 150 мкл $l = 0,42$ см.

3. Определение температуры агрегации белка методом динамического светорассеяния.

Определение точки агрегации исследуемых белков (в концентрации 1-5 мг/мл) осуществляли на приборе DynaPro Plate Reader II. Для этого 35 мкл раствора помещали в лунку планшета из черного пластика с прозрачным дном, который постепенно нагревали в установке при постоянном измерении интенсивности рассеянного света.

Параметры измерения:

- Начальная температура измерения – 25 °С.
- Интенсивность рассеянного света при $\theta = 158^\circ$.
- Число измерений на один повтор – 3.
- Время одного измерения – 5 с.
- Скорость нагрева – 0,15 °С/мин.
- Конечная температура – 80 °С.

Температурный тренд и точка агрегации были определены с использованием ПО Dynamics V7.

4. Определение температуры плавления белка методом дифференциальной сканирующей флуориметрии.

К образцу белка добавляли флуоресцентный краситель Sypro Orange. Анализировали в амплификаторе CFX96 C1000 Touch Thermal Cycler в режиме реального времени. Нагрев проводили от 25 до 85 °С, канал детектирования - ROX. Для обработки результатов использовали программное обеспечение CFX Manager (Bio-Rad).

5. Определение гидродинамического радиуса частиц в растворе методом динамического светорассеяния.

Для проведения анализа в лунки планшета из черного пластика с прозрачным дном помещали 35 мкл образца в каждой концентрации. Анализ проводили на приборе DynaPro Plate Reader II. Каждую лунку анализировали 10 раз. Полученные данные обрабатывали в программном обеспечении Dynamics V7.

6. Определение параметра диффузионного взаимодействия (k_D) методом динамического светорассеяния.

Последовательным разведением получали ряд растворов белка от 30 мг/мл до 0,94 мг/мл. В качестве растворителя использовали соответствующие растворы вспомогательных веществ.

Для проведения анализа в лунки планшета из черного пластика с прозрачным дном помещали 35 мкл образца в каждой концентрации. Анализ

проводили на приборе DynaPro Plate Reader II. Каждую лунку анализировали 10 раз. Полученные данные обрабатывали в программном обеспечении Dynamics V7, где строили зависимость коэффициента диффузии от концентрации белка в растворе и определяли угол наклона прямой для полученной зависимости.

7. Определение термической стабильности при термострессе при 50 °С (TS50).

Исследуемые образцы разделяли на две аликвоты по 150 мкл и помещали в отдельные стеклянные виалы: по одной виале на каждый состав откладывали в холодильник на хранение при 5 ± 3 °С, остальные устанавливали в термостат и инкубировали при 50 °С в течение 96 часов. При отборе контрольных точек или после окончания прогрева виалы убирали из термостата, выдерживали при комнатной температуре около 15 мин и передавали на анализ.

8. Определение коллоидной стабильности при шейкировании (SH800).

Исследуемые образцы разделяли на две аликвоты по 150 мкл и помещали в стеклянные виалы по одной виале на каждый состав откладывали в холодильник на хранение при температуре 5 ± 3 °С, остальные устанавливали в термошейкер и шейкировали со скоростью 800 об./мин при температуре 5 ± 3 °С в течение 96 часов. При отборе контрольных точек или после окончания стресса виалы убирали из термошейкера и передавали на анализ.

9. Определение коллоидной стабильности при замораживании и оттаивании (FT(-20)).

Исследуемые образцы разделяли на две аликвоты и помещали в полимерные пробирки: по одной пробирке на каждый состав откладывали в холодильник на хранение при 5 ± 3 °С, остальные устанавливали в морозильную камеру и хранили при температуре не выше -18 °С до полной заморозки. После пробирки убирали из морозильной камеры, выдерживали при комнатной температуре до полного оттаивания содержимого,

перемешивали растворы с помощью вортекса и снова устанавливали в морозильную камеру. Повторяли не менее 3 раз. После окончания стресса пробирки убирали из морозильной камеры, выдерживали при комнатной температуре до полного оттаивания содержимого, перемешивали растворы с помощью вортекса и передавали на анализ.

10. Определение стабильности при кислотном гидролизе (Acid).

Исследуемые образцы разделяли на две аликвоты и помещали в полимерные пробирки: по 1 пробирке на каждый состав откладывали в холодильник на хранение при 5 ± 3 °С (входной контроль допускается передавать на анализ единожды для всех исследований при старте хранения), у остальных доводили рН до $3,5 \pm 0,1$ раствором хлористоводородной кислоты при перемешивании, после чего убирали в холодильник на хранение при 5 ± 3 °С. По истечении 1 ч гидролиз останавливали при перемешивании добавлением раствора гидроксида натрия до исходного значения рН. Затем растворы передавали на анализ.

11. Определение стабильности при щелочном гидролизе (Basic).

Исследуемые образцы разделяли на две аликвоты и помещали в полимерные пробирки: по одной пробирке на каждый состав откладывали в холодильник на хранение при 5 ± 3 °С (входной контроль допускается передавать на анализ единожды для всех исследований при старте хранения), у остальных доводили рН до $8,5 \pm 0,1$ раствором гидроксида натрия при перемешивании, после чего убирали в холодильник на хранение при 5 ± 3 °С. По истечении 1 ч гидролиз останавливали при перемешивании добавлением раствора хлористоводородной кислоты до исходного значения рН. Затем растворы передавали на анализ.

12. Ускоренное хранение.

Исследуемые образцы разделяли на отдельные аликвоты (одна для входного контроля – допускается передавать на анализ единожды для всех исследований при старте хранения) и помещали в отдельные стерильные стеклянные флаконы: часть флаконов на каждый состав откладывали в

холодильник на хранение при 5 ± 3 °С (входной контроль), остальные устанавливали в термостат и инкубировали при 25 ± 2 °С в течение 6 месяцев, периодически отбирая контрольные точки согласно плану. При отборе контрольных точек и после завершения хранения флаконы убрали из термостата и передавали на анализ.

13. Определение чистоты образцов методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (Э ВЭЖХ).

Колонка Tosoh TSK-GelG3000SWXL 7.8 mm ID × 30 cm, 5 мкм.

Предколонка: TSK-Gel Guard SW_{XL}, 6,0 мм ID × 4,0 см, 7 мкм, 300Å.

Температура колонки: 25°С.

Скорость потока подвижной фазы: 0,5 мл/мин.

Объем вкола: 25 мкл.

Концентрация образца: 0,5 мг/мл.

Длина волны детектора: 214 и 360 нм.

Продолжительность элюирования: 30 мин.

Подвижная фаза: Динатрия гидрофосфат б/в 14,2 мг/мл.

Натрия хлорид 11,7 мг/мл.

рН подвижной фазы довели до 6,9 ортофосфорной кислотой.

14. Оценка профиля заряженных форм в капилляре на приборе Caliper LabChip GX II.

Анализ проводили в соответствии с инструкцией к набору NT Protein charge variant kit. Испытуемые образцы довели до концентрации белка 1 мг/мл с помощью разведения или концентрирования в центрифужных фильтрах Amicon Ultra 10 кДа на 0,5 мл (Millipore) (в зависимости от исходной концентрации образцов). Содержание белка контролировали методом УФ-спектрофотометрии при длине волны 280 нм.

В каждый полученный образец добавляли по 2 мкл раствора карбоксипептидазы и инкубировали в течение 2 часов при температуре 37 ± 2 °С. По истечении указанного времени образцы диализовали против воды в центрифужных пробирках Amicon Ultra и концентрировали до 2 мг/мл.

В 96-луночный планшет вносили установленные инструкцией количества раствора Labelling Buffer, раствора Dye Mixture и 25 мкл испытуемого образца, планшет ставили в темное место на 10 минут, затем в каждую лунку добавляли по 60 мкл воды и перемешивали.

Планшет с растворами центрифугировали с использованием планшетного ротора на центрифуге и устанавливали в прибор Caliper LabChip GX II. Для проведения анализа использовали специальный чип, который заполняют буферным раствором Running Buffer с рН, установленный в соответствии с инструкцией. Обработку результатов проводили с помощью ПО LabChip GX.

15. Определение профиля заряженных форм методом ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ИО ВЭЖХ).

Колонка: ProPac WCX-10, 4×250 мм, размер частиц 10 мкм (Thermo Scientific, США).

Предколонка: ProPac WCX-10G, 4×50 мм, размер частиц 10 мкм (Thermo Scientific, США).

Элюент А: Раствор 20 мМ 2-(N-морфолино)-этансульфоновой кислоты, 4% ацетонитрила, рН = 7,0.

Элюент В: Раствор 20 мМ натрий фосфатного буфера, 95 мМ NaCl, 4% ацетонитрила, рН = 8,0.

Скорость потока: 0,6 мл/мин - 1,0 мл/мин.

Температура колонки: 45 °С.

Температура автосэмплера: 5 °С.

Детектор: УФ, 280 нм.

Референсная длина волны: 360 нм, ширина окна пропускания (bandwidth) 100 нм.

Объем пробы: 80 мкл.

Время хроматографирования: 43 мин.

Исследуемый образец разводили до концентрации 1,0 мг/мл и проводили обработку карбоксипептидазой В в соотношении 100:1 в течение 20 минут при температуре 37 ± 2 °С.

Режим элюирования: Элюент А от 100% до 80%, элюент В от 0% до 20%.

16. Определение чистоты и родственных примесей методом капиллярного гель-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии и без додецилсульфата натрия (КЭФ ред. и неред.).

Образец разводили до концентрации 4,0 мг/мл. 23 мкл полученного раствора помещали в микропробирку вместимостью 1,5 мл, добавляли 70 мкл буфера для приготовления образцов SDS-MW Sample Buffer, 2 мкл внутреннего стандарта с молекулярной массой 10 кДа, 5 мкл 0,5 М раствора йодацетамида (КЭФ неред.) или 5 мкл 2-меркаптоэтанол (КЭФ ред.). Полученный раствор перемешивали в течение 15 с, центрифугировали в течение 5 с при скорости 2800 об/мин и помещали в твердотельный термостат при 70°С на 30 мин. Раствор охлаждали до комнатной температуры.

В программном обеспечении 32Karat Software использовали методику анализа SDS MW Separation – PA 800 plus.met.

Условия проведения капиллярного гель-электрофореза:

Капилляр: 50 мкм × 30,2 см.

Эффективная длина капилляра: 20,0 см.

Полярность: обратная, вход слева (-), выход справа (+).

Температура капилляра: 25°С.

Время анализа и напряжения разделения: 35 мин, 15 кВ.

Длина волны детектирования: 220 нм.

17. Определение относительной специфической активности.

Специфическую активность определяли с помощью биологического теста способности блокировать PD-L1 зависимое ингибирование активации репортерной клеточной линии Т-лимфоцитов Jurkat-PD1-NFAT. Пробоподготовку проводили с использованием роботизированной станции Liquid Handling Arm (LiHa), в качестве СКО (среды для количественного

определения) использовали RPMI-1640 с 25 мМ HEPES, с 24 мМ натрия гидрокарбонатом, содержащей 2 мМ L-глутамин, 10 % FBS, 50 мкг/мл гентамицина.

Исследуемый образец антитела разводили с использованием СКО (среды для количественного определения) до концентрации 1 мг/мл и помещали в роботизированную станцию. С помощью Liquid Handling Arm (LiHa) роботизированной станции проводили подготовку трех независимых разведений стандартного и исследуемого образцов в концентрациях 1 000, 50, 10, 1, 0,5, 0,25, 0,1, 0,025, 0,01, 0,001 мкг/мл с использованием СКО. Переносили разведения в культуральные планшеты, вносили клеточную суспензию Raji-PDL1 cl.3, стабильно экспрессирующую PDL-1 в концентрации $(1,00 \pm 0,1) \times 10^6$ клеток/мл, суспензию репортерной клеточной линии Jurkat-NFAT-PD1 cl.1 в концентрации $(1,67 \pm 0,1) \times 10^6$ клеток/мл и биспецифичные антитела против CD3/CD20. Культуральные планшеты помещали в CO₂-инкубатор, инкубировали при температуре (37 ± 1) °C в увлажненном воздухе с содержанием углерода диоксида 5 % в течение 22-24 ч.

По истечении срока инкубации культуральные планшеты выдерживали при комнатной температуре не менее 15 мин и добавляли люциферазный субстрат BioGlo. Проводили измерение уровня люминесценции в относительных единицах люминесценции (RLU) с помощью микропланшетного ридера и программного обеспечения Magellan 7.2. На основании результатов измерения люминесценции для каждого планшета строили четырех-параметрические кривые, оптимизированные по алгоритму Левенберга-Марквардта для стандартного и испытуемого образцов, рассчитывали относительную специфическую активность испытуемого образца от стандартного образца.

18. Определение продуктов окисления методом высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофобных взаимодействий (ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий).

Колонка: TSKgel Phenyl-5PW 7.5 × 75 мм, размер частиц 10 мкм (Tosoh Booscience, Япония).

Элюент А: Раствор 5 мМ натрия фосфатный буфер, 2% ацетонитрила, рН = 7,0.

Элюент В: Раствор 5 мМ натрий фосфатного буфера, 400 мМ аммония сульфата, 4% ацетонитрила, рН = 6,9.

Скорость потока: 0,5 мл/мин.

Температура колонки: 30 °С.

Температура автосэмплера: 5 °С.

Детектор: УФ, 280 нм, ширина окна пропускания (bandwidth) 16 нм.

Референсная длина волны: 360 нм, ширина окна пропускания (bandwidth) 100 нм.

Объем пробы: 25 мкл.

Время хроматографирования: 82 мин.

Исследуемый образец разводили до концентрации 3,0 мг/мл и проводили обработку карбоксипептидазой В в соотношении 100:1 в течение 20 минут при температуре 37 ± 2 °С.

Режим элюирования: Элюент А от 0% до 100%, элюент В от 100% до 0%.

19. Определение стабильности при окислении.

Исследуемые образцы разделяли на две аликвоты по 150 мкл и помещали в отдельные стеклянные виалы: по одной виале на каждый состав откладывали в холодильник на хранение при 5 ± 3 °С, к остальным образцам добавляли пероксид водорода из расчета конечной концентрации водорода пероксида в образцах 0,1%, выдерживали в течение 4 часов при температуре (5 ± 3) °С. Окисление останавливали добавлением эквивалентного количества L-метионин.

20. Определение стабильности при фотовоздействии.

Исследуемые образцы разделяли на две аликвоты и помещали в отдельные стеклянные флаконы. В качестве темновых контролей

использовали препарат во вторичной упаковке, плотно обернутый алюминиевой фольгой. Все образцы помещали в климатическую камеру с источником освещения, и запускают программу фотовоздействия с уровнем, равным 1,2 млн. лк·ч и 200 Вт·ч/м² (доза ICH×1). При достижении установленного уровня воздействия извлекали все образцы из камеры и передавали на анализ.

21. Обработка результатов.

Абсолютное изменение показателей качества в ходе стрессов рассчитывали по формуле:

$$\Delta = (\text{значение после стресса} - \text{значение до стресса})$$

Абсолютное изменение профиля заряженных форм рассчитывали по формуле (abs):

$$\Delta = |\text{содержание кисл. фракций до стресса} - \text{содержание кисл. фракций после стресса}| \\ + |\text{содержание щел. фракций до стресса} \\ - \text{содержание щел. фракций после стресса}| \\ + |\text{содержание доминир. фракции до стресса} \\ - \text{содержание доминир. фракции после стресса}|$$

Пример 1. Выбор буферной системы.

В настоящем исследовании в качестве основы фармацевтической композиции выбраны 2 типовые буферные системы, пригодные для парентерального введения: ацетатная и гистидиновая. Исследование проводили в формате полного двухфакторного эксперимента с двумя уровнями и центральной точкой. В качестве количественных факторов исследовали уровень pH (от 5,0 до 6,5) и концентрацию буферных агентов (от 5 до 50 мМ).

Для оценки пригодности буферных систем было проведено исследование влияния природы буферного раствора на коллоидную и конформационную стабильность белка. В качестве отклика определяли температуру агрегации, температуру плавления, параметр диффузионного взаимодействия, изменение чистоты и кислотно-щелочного профиля после

термического воздействия. Исследуемые фармацевтические композиции представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Исследуемые составы

Обозначение	Состав	
5 mM Acet pH 6,0	Пембролизумаб	1,5–5 мг/мл
	Натрия ацетат тригидрат	0,644 мг/мл
	Уксусная кислота ледяная	до pH 6,0
50 mM Acet pH 6,0	Пембролизумаб	1,5–5 мг/мл
	Натрия ацетат тригидрат	6,442 мг/мл
	Уксусная кислота ледяная	до pH 6,0
50 mM Acet pH 5,0	Пембролизумаб	1,5–5 мг/мл
	Натрия ацетат тригидрат	0,436 мг/мл
	Уксусная кислота ледяная	до pH 5,0
5 mM Acet pH 5,0	Пембролизумаб	1,5–5 мг/мл
	Натрия ацетат тригидрат	4,355 мг/мл
	Уксусная кислота ледяная	до pH 5,0
27,5 mM Acet pH 5,5	Пембролизумаб	1,5–5 мг/мл
	Натрия ацетат тригидрат	3,177 мг/мл
	Уксусная кислота ледяная	до pH 5,5
5 mM His pH 6,5	Пембролизумаб	1,5–5 мг/мл
	L-гистидин	0,589 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,252 мг/мл
50 mM His pH 6,5	Пембролизумаб	1,5–5 мг/мл
	L-гистидин	5,894 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	2,518 мг/мл
50 mM His pH 5,5	Пембролизумаб	1,5–5 мг/мл
	L-гистидин	1,864 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	7,963 мг/мл
5 mM His pH 5,5	Пембролизумаб	1,5–5 мг/мл
	L-гистидин	0,186 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,796 мг/мл
27,5 mM His pH 6,0	Пембролизумаб	1,5–5 мг/мл
	L-гистидин	2,133 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	2,882 мг/мл
Буф. р-р Китруда	Пембролизумаб	1,5–5 мг/мл
	L-гистидин	0,300 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	1,700 мг/мл

Исследование показателей прогнозирования стабильности.

Параметр диффузионного взаимодействия (k_D) отражает зависимость коэффициента диффузии образца от концентрации молекул. Если при увеличении концентрации коэффициент диффузии снижается ($k_D < 0$), то полидисперсность данного раствора увеличивается и в нем образуются более крупные частицы. Такие образцы обладают низкой растворимостью и склонны к агрегации, а их составы не рекомендуются для использования.

Температура агрегации и плавления позволяет оценить склонность белка к агрегации. Наиболее стабильны те образцы, в которых агрегация частиц начинается при большей температуре и где при нагревании образуются менее крупные частицы.

Результаты исследования температуры агрегации методом 3, температуры плавления методом 4 и параметр диффузионного взаимодействия методом 6 представлены в таблице 2. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 2 – Результаты исследования показателей прогнозирования стабильности

Обозначение состава	Температура плавления, °C			Т агр, °C	k_D
	Т нач	Т1	Т2		
5 mM Acet pH 6,0	54,1	64,3	67,3	62,09	-1,35E-02
50 mM Acet pH 6,0	53,8	64,6	нет	58,8	6,44E-03
50 mM Acet pH 5,0	45,7	58,3	65,5	59,8	6,60E-03
5 mM Acet pH 5,0	47,5	60,7	67,3	64,12	3,09E-02
27,5 mM Acet pH 5,5	51,4	62,8	66,1	61,59	-6,64E-03
27,5 mM Acet pH 5,5	52	63,1	65,8	61,55	-6,83E-03
5 mM His pH 6,5	55,6	64,6	нет	61,65	1,35E-02
50 mM His pH 6,5	54,1	64,3	нет	61,02	-1,24E-02
50 mM His pH 5,5	47,8	57,4	69,4	58,09	-6,86E-03
5 mM His pH 5,5	49	59,5	67,0	63,24	2,19E-02
27,5 mM His pH 6,0	52,9	62,8	66,4	61,35	-8,09E-03
27,5 mM His pH 6,0	52,6	62,8	66,1	61,38	-8,94E-03
Буф. р-р Китруда	48,1	59,5	67,0	63,7	8,06E-03

Определение термической стабильности.

Оценка термической стабильности выполнена методом 7. До и после термостресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм в капилляре методом 14, гидродинамический радиус методом 5. Результаты представлены в таблице 3. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 3 – Результаты определения термической стабильности

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел.	Осн.	Кисл.	Δ abs
	IC	TS50 96H	IC	Δ TS50 96H	IC	Δ TS50 96H	IC			TS50 96H
5 mM Acet pH 6,0	5,6	5,9	0,55	0,93	99,42	-1,58	3,65	81,80	14,56	14,05
50 mM Acet pH 6,0	5,2	5,6	0,54	0,92	99,42	-1,54	3,69	81,51	14,79	15,89
50 mM Acet pH 5,0	5,4	5,9	0,52	5,07	99,43	-5,85	3,96	80,00	16,04	23,94
5 mM Acet pH 5,0	4,2	4,2	0,49	0,76	99,44	-1,53	3,83	78,38	17,80	7,17
27,5 mM Acet pH 5,5	6	5,8	0,53	1,36	99,41	-2,01	3,91	78,49	17,61	8,27
27,5 mM Acet pH 5,5	5,6	5,8	0,54	1,46	99,40	-2,11	3,89	77,45	18,66	10,60
5 mM His pH 6,5	5,8	4,9	0,55	0,55	99,32	-1,25	3,56	78,51	17,93	18,22
50 mM His pH 6,5	5,7	5,9	0,49	0,60	99,46	-1,45	3,75	78,44	17,81	20,45
50 mM His pH 5,5	5,6	6,3	0,47	4,70	99,44	-5,75	3,70	78,08	18,22	11,32
5 mM His pH 5,5	4,7	4,6	0,47	0,95	99,48	-1,74	3,86	78,11	18,03	5,74
27,5 mM His pH 6,0	5,7	5,7	0,46	0,78	99,50	-1,65	3,53	79,06	17,42	13,77
27,5 mM His pH 6,0	5,6	5,7	0,46	0,80	99,48	-1,68	3,87	78,68	17,45	9,17
Буф. p-p Китруда	6,3	10,8	0,46	0,87	99,52	-1,81	3,68	81,43	14,89	11,32

Полученные данные обработали в программном обеспечении Minitab и построили модели для выбора состава, оказывающего наиболее

стабилизирующий эффект. В построении модели участвовали только те отклики (показатели качества), на которые было отмечено значимое влияние факторов (рН и моляльности буферного раствора). Для остальных откликов, не включенных в модель для оптимизации, считали, что в исследуемом диапазоне факторов статистически значимого отличия не наблюдается. По результатам оптимизации выбран 5 мМ гистидиновый буферный раствор с рН 5,6, для приготовления которого необходимы:

L-гистидин	0,221 мг/мл
L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл

При приготовлении раствора по конкретным содержаниям L-гистидина и L-гистидина гидрохлорида моногидрата рН может немного отклоняться от заданного и варьироваться в диапазоне рН 5,5 – 5,7 (рН $5,6 \pm 0,1$).

Данный состав показал наилучшие стабилизирующие свойства среди всех исследуемых образцов. По результатам модели в гистидиновом буферном растворе ожидается минимальное изменение содержания мономера (белка) и агрегатов при термическом воздействии, а также высокие значения температуры агрегации и параметра диффузионного взаимодействия. У оптимального состава по сравнению с буферным раствором Китруды наблюдается меньшее изменение содержания мономера при термическом воздействии, меньшее изменение содержания агрегатов и повышенное значение параметра диффузионного взаимодействия, что говорит о большей коллоидной стабильности.

Пример 2. Выбор осмотического агента.

Исследуемые составы.

В качестве осмотических агентов исследовали пригодные для парентерального введения вспомогательные вещества. Исследуемые составы представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Исследуемые составы

Обозначение	Состав	
5 mM His, pH 5,6	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
His + Tre 100 мг/мл	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы дигидрат	100 мг/мл
His + Sorb 50 мг/мл	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Сорбитол	50 мг/мл
His + Prol 30 мг/мл	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	L-пролин	30 мг/мл
His + NaCl 9,0 мг/мл	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Натрия хлорид	9,0 мг/мл
Буф. р-р Китруды + Sucr	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,300 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	1,700 мг/мл
	Сахароза	70,0 мг/мл

Исследование показателей прогнозирования стабильности.

Результаты исследования температуры агрегации методом 3, температуры плавления методом 4 и параметр диффузионного взаимодействия методом 6 для выбора осмотического агента представлены в таблице 5. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 5 – Результаты исследования показателей прогнозирования стабильности

Обозначение состава	Температура плавления, °С			T agr, °С	k _D
	T нач	T1	T2		
5 mM His Buf, pH 5,6	50,8	60,4	67,3	64,33	1,89E+02

His + Tre 100 мг/мл	52,9	62,2	68,2	66,02	2,74E-02
His + Sorb 50 мг/мл	51,7	61,3	67,9	65,81	2,51E-02
His + Prol 30 мг/мл	50,5	61,6	67,6	65,18	3,05E-02
His + NaCl 9.0 мг/мл	46,3	58,3	65,2	58,24	-8,56E-03
Буф.р-р Китруды + Sucr	50,5	59,2	67,0	63,44	9,22E-03

Определение термической стабильности.

Оценка термической стабильности выполнена методом 7. До и после термостресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм в капилляре методом 14, гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 6. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 6 – Результаты определения термической стабильности

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел.	Осн.	Кисл.	Δ abs
	IC	TS50 96H	IC	Δ TS50 96H	IC	Δ TS50 96H				
5 mM His Buf, pH 5,6	4,7	4,8	0,44	0,58	99,53	-1,56	2,81	83,30	13,90	9,62
His + Tre 100 мг/мл	6,1	5,7	0,43	0,22	99,50	0,03	2,77	84,15	13,09	10,72
His + Sorb 50 мг/мл	5,2	5,4	0,44	0,41	99,53	-1,47	2,66	83,28	14,06	14,06
His + Prol 30 мг/мл	5,1	5,1	0,43	0,49	99,55	-1,51	2,59	84,19	13,23	11,30
His + NaCl 9.0 мг/мл	5,7	7,4	0,45	2,80	99,53	-4,11	2,73	83,05	14,23	11,46
Буф.р-р Китруды + Sucr	6,2	5,8	0,42	0,94	99,54	-2,12	2,73	85,04	12,24	13,41

Определение стабильности при шейкировании.

Оценка стабильности при шейкировании выполнена методом 8. До и после шейкирования определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм в капилляре методом 14, гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 7. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 7 – Результаты определения стабильности при шейкировании

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел	Осн.	Кисл	Δ abs
	IC	SH800 96H	IC	Δ SH80 0 96H	IC	Δ SH80 0 96H	IC			SH80 0 96H
5 мМ His Buf, pH 5,6	4,7	4,7	0,44	-0,01	99,5 3	0,02	2,81	83,3 0	13,90	1,35
His + Tre 100 мг/мл	6,1	5,7	0,43	-0,01	99,5 0	-0,02	2,77	84,1 5	13,09	0,50
His + Sorb 50 мг/мл	5,2	5,2	0,44	-0,01	99,5 3	0,03	2,66	83,2 8	14,06	2,39
His + Prol 30 мг/мл	5,1	4,9	0,43	-0,02	99,5 5	0,02	2,59	84,1 9	13,23	2,37
His + NaCl 9.0 мг/мл	5,7	5,5	0,45	-0,03	99,5 3	0,04	2,73	83,0 5	14,23	1,81
Буф.р-р Китруды + Sucr	6,2	23,3	0,42	0,00	99,5 4	-0,02	2,73	85,0 4	12,24	2,13

Определение стабильности при замораживании и оттаивании.

Оценка стабильности при замораживании и оттаивании выполнена методом 9. До и после стресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм в капилляре методом 14, гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 8. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 8 – Результаты определения стабильности при замораживании и оттаивании

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел.	Осн.	Кисл.	Δ abs
	IC	FT (-20) *5	IC	Δ FT (-20) *5	IC	Δ FT (-20) *5	IC			FT (-20) *5
5 мМ His Buf, pH 5,6	4,7	6,1	0,44	0,60	99,53	-0,58	2,81	83,30	13,90	1,88
His + Tre 100 мг/мл	6,1	6,1	0,43	0,20	99,50	-0,22	2,77	84,15	13,09	1,43
His + Sorb 50 мг/мл	5,2	6,3	0,44	0,19	99,53	-0,18	2,66	83,28	14,06	1,05
His + Prol 30 мг/мл	5,1	5,7	0,43	0,06	99,55	-0,06	2,59	84,19	13,23	1,26
His + NaCl 9.0 мг/мл	5,7	5,8	0,45	0,20	99,53	-0,20	2,73	83,05	14,23	2,59
Буф.р-р Китруды + Sucr	6,2	7,5	0,42	0,13	99,54	-0,12	2,73	85,04	12,24	2,36

Составы, содержащие трегалозы дигидрат и L-пролин, показали наилучшие стабилизирующие свойства среди всех исследуемых образцов. Образец, содержащий трегалозы дигидрат, показал наилучшие результаты по температуре агрегации и температуре плавления. Также у данной пробы наблюдалось наименьшее изменение показателей качества при термическом воздействии, отмечены незначительные изменения при шейкировании. Образец, содержащий L-пролин, также показал один из наилучших результатов температуры агрегации и средний результат температуры плавления. У композиции с L-пролином отмечены средние результаты при термическом воздействии, низкое изменение показателей качества при шейкировании, лучший результат при замораживании и размораживании.

Внесение трегалозы дигидрата или L-пролина, выбранных для следующего этапа, снижает прирост агрегатов при замораживании/размораживании и термострессе. Также в выбранных составах наблюдается незначительное изменение качества при шейкировании.

Выбранные осмотические агенты по сравнению с составом, содержащим сахарозу, обеспечивают повышенную термическую стабильность, в частности отмечено увеличение температуры плавления, температуры агрегации, отмечен меньший прирост агрегатов при термическом воздействии и меньшее изменение содержания мономера, также наблюдается меньшее абсолютное изменение кислотно-щелочного профиля. Образец, содержащий в составе вспомогательных веществ трегалозы дигидрат, показал лучшие результаты параметра диффузионного взаимодействия, что свидетельствует о повышенной стабильности и меньшей склонности к агрегации при концентрировании и диафильтрации. По сравнению с составом, содержащим сахарозу, у исследуемых составов с трегалозы дигидратом, сорбитолом или L-пролином наблюдается значительно меньший прирост гидрадинамического радиуса частиц при шейкировании и замораживании, что свидетельствует об образовании крупных высокомолекулярных частиц.

Взяты на следующий этап составы вспомогательных веществ:

His + Tre 100 мг/мл:	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы дигидрат	100 мг/мл
His + Prol 30 мг/мл:	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	L-пролин	30 мг/мл

Пример 3. Скрининг осмотических агентов и стабилизаторов.

Для проведения скрининга осмотических агентов и стабилизаторов были использованы вспомогательные вещества, пригодные для парентерального введения. Исследуемые составы представлены в таблице 9. Фармацевтические композиции, содержащие пемболизумаб в исследуемых составах, были получены в соответствии с методикой 2.

Таблица 9 – Исследуемые составы

Обозначение	Состав	
His+Tre	Пембролизумаб L-гистидин L-гистидина гидрохлорид моногидрат Трегалозы дигидрат	1,5–30 мг/мл 0,221 мг/мл 0,750 мг/мл 100 мг/мл
His+Tre + Аргинина г/х 100 мМ	Пембролизумаб L-гистидин L-гистидина гидрохлорид моногидрат Трегалозы дигидрат Аргинина гидрохлорид моногидрат	1,5–30 мг/мл 0,221 мг/мл 0,750 мг/мл 100 мг/мл 21,07 мг/мл
His+Tre + Глицин 100 mM	Пембролизумаб L-гистидин L-гистидина гидрохлорид моногидрат Трегалозы дигидрат Глицин	1,5–30 мг/мл 0,221 мг/мл 0,750 мг/мл 100 мг/мл 7,51 мг/мл
His+Tre + Метионин 10 mM	Пембролизумаб L-гистидин L-гистидина гидрохлорид моногидрат Трегалозы дигидрат Метионин	1,5–30 мг/мл 0,221 мг/мл 0,750 мг/мл 100 мг/мл 1,490 мг/мл
His+Prol	Пембролизумаб L-гистидин L-гистидина гидрохлорид моногидрат L-пролин	1,5–30 мг/мл 0,221 мг/мл 0,750 мг/мл 30 мг/мл
His+Prol + Аргинина г/х 100 мМ	Пембролизумаб L-гистидин L-гистидина гидрохлорид моногидрат L-пролин Аргинина гидрохлорид моногидрат	1,5–30 мг/мл 0,221 мг/мл 0,750 мг/мл 30 мг/мл 21,07 мг/мл
His+Prol + Глицин 100 mM	Пембролизумаб L-гистидин L-гистидина гидрохлорид моногидрат L-пролин Глицин	1,5–30 мг/мл 0,221 мг/мл 0,750 мг/мл 30 мг/мл 7,51 мг/мл
His+Prol + Метионин 10 mM	Пембролизумаб L-гистидин L-гистидина гидрохлорид моногидрат L-пролин Метионин	1,5–30 мг/мл 0,221 мг/мл 0,750 мг/мл 30 мг/мл 1,490 мг/мл
Буф.р-р Китруды + Sucr	Пембролизумаб L-гистидин L-гистидина г/х м/г	1,5–30 мг/мл 0,3 мг/мл 1,7 мг/мл

	Сахароза	70 мг/мл
pl Китруды	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,3 мг/мл
	L-гистидина г/х м/г	1,7 мг/мл
	Сахароза	70 мг/мл
	Полисорбат 80	0,2 мг/мл
His+Tre + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы дигидрат	100 мг/мл
	Полисорбат 80	0,5 мг/мл
His+Tre + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы дигидрат	100 мг/мл
	Полоксамер 188	0,5 мг/мл
His+Prol + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	L-пролин	30 мг/мл
	Полисорбат 80	0,5 мг/мл
His+Prol + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	L-пролин	30 мг/мл
	Полоксамер 188	0,5 мг/мл

Исследование показателей прогнозирования стабильности.

Результаты исследования температуры агрегации методом 3, температуры плавления методом 4 и параметр диффузионного взаимодействия методом 6 для выбора осмотического агента представлены в таблице 10. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 10 – Результаты исследования показателей прогнозирования стабильности

Обозначение состава	Температура плавления, °С			Т агр, °С	k _D
	Т нач	T1	T2		
His+Tre	51,7	61,9	68,2	66,05	8,23E-03

His+Tre + Аргинина г/х 100 мМ	47,2	59,5	64,9	60,59	-9,31E-03
His+Tre + Глицин 100 мМ	52,3	62,5	68,5	66,42	1,10E-02
His+Tre + Метионин 10 мМ	51,4	61,9	68,5	66,12	1,13E-02
His+Prol	51,1	61,3	67,3	64,17	2,97E-02
His+Prol + Аргинина г/х 100 мМ	47,5	59,2	64,6	59,56	-5,11E-03
His+Prol + Глицин 100 мМ	50,8	61,9	67,9	64,61	3,36E-02
His+Prol + Метионин 10 мМ	50,8	61,3	67,3	64,34	3,24E-02
Буф.р-р Китруды + Sucr	48,7	59,2	67,0	63,63	9,22E-03
pl Китруды	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
His+Tre + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
His+Tre + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
His+Prol + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
His+Prol + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Определение термической стабильности.

Оценка термической стабильности выполнена методом 7. До и после термостресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм в капилляре методом 14, гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 11. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 11 – Результаты определения термической стабильности

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел.	Осн.	Кисл.	Δ abs
	IC	TS50 96H	IC	Δ TS50 96H	IC	Δ TS50 96H				
His+Tre	5,5	5,5	0,47	-0,04	99,49	0,03	2,78	85,19	12,04	1,83
His+Tre + Аргинина г/х 100 мМ	7,2	6,9	0,51	0,00	99,46	-0,02	2,81	85,41	11,79	1,51

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел.	Осн.	Кисл.	Δ abs
	IC	TS50 96H	IC	Δ TS50 96H	IC	Δ TS50 96H	IC			TS50 96H
His+Tre + Глицин 100 мМ	5,6	5,5	0,47	-0,04	99,49	0,05	2,79	84,99	12,23	1,28
His+Tre + Метионин 10 мМ	5,4	5,5	0,47	-0,02	99,49	0,02	2,74	84,70	12,57	1,58
His+Prol	5	5	0,46	-0,01	99,48	0,01	2,78	84,01	13,21	2,83
His+Prol + Аргинина г/х 100 мМ	6,1	6	0,47	-0,01	99,48	-0,01	2,70	85,16	12,15	1,77
His+Prol + Глицин 100 мМ	5,3	4,9	0,47	-0,03	99,49	0,02	2,94	85,17	11,90	3,41
His+Prol + Метионин 10 мМ	5,2	4,9	0,46	-0,02	99,53	-0,03	2,79	84,52	12,70	0,57
Буф.р-р Китруды + Sucr	6,1	5,9	0,45	-0,02	99,53	0,01	2,71	84,59	12,71	2,05
pI Китруды	5,9	n/a	0,46	n/a	99,52	-0,03	3,11	84,03	12,87	1,41
His+Tre + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	5,5	n/a	0,54	n/a	99,43	n/a	3,23	83,61	13,17	n/a
His+Tre + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	5,5	n/a	0,46	n/a	99,51	n/a	3,12	84,62	12,27	n/a
His+Prol + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	5,1	n/a	0,52	n/a	99,43	n/a	3,15	84,86	12,00	n/a
His+Prol + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	4,9	n/a	0,46	n/a	99,51	n/a	2,96	84,73	12,31	n/a

Определение стабильности при кислотном гидролизе.

Оценка стабильности при кислотном гидролизе для составов, не содержащих полоксамер 188, выполнена методом 10 с доведением до pH 3,5 и выдерживанием в течение 1 часа. До и после гидролиза определены чистота

методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм в капилляре методом 14, гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 12. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 12 – Результаты определения стабильности при кислотном гидролизе

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел.	Осн.	Кисл.	Δ abs
	IC	Acid 3.5 1H	IC	Δ Acid 3.5 1H	IC	Δ Acid 3.5 1H	IC			Acid 3.5 1H
His+Tre	5,5	14,9	0,47	29,91	99,49	-30,34	2,78	85,19	12,04	n/a
His+Tre + Аргинина г/х 100 мМ	7,2	8,9	0,51	4,99	99,46	-5,01	2,81	85,41	11,79	13,64
His+Tre + Глицин 100 мМ	5,6	12,2	0,47	1,77	99,49	-1,77	2,79	84,99	12,23	5,97
His+Tre + Метионин 10 мМ	5,4	18,3	0,47	3,24	99,49	-3,24	2,74	84,70	12,57	4,92
His+Prol	5	12,8	0,46	4,48	99,48	-4,49	2,78	84,01	13,21	4,77
His+Prol + Аргинина г/х 100 мМ	6,1	6,6	0,47	5,27	99,48	-5,26	2,70	85,16	12,15	3,54
His+Prol + Глицин 100 мМ	5,3	7,6	0,47	2,64	99,49	-2,63	2,94	85,17	11,90	1,20
His+Prol + Метионин 10 мМ	5,2	7	0,46	0,76	99,53	-0,79	2,79	84,52	12,70	4,77
Буф.р-р Китруды + Sucr	6,2	9,5	0,45	62,96	99,53	-64,53	2,71	84,59	12,71	23,15
pI Китруды	5,9	n/a	0,46	n/a	99,52	n/a	3,11	84,03	12,87	n/a
His+Tre + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	5,5	n/a	0,54	n/a	99,43	n/a	3,23	83,61	13,17	n/a
His+Tre + Полоксамер	5,5	n/a	0,46	n/a	99,51	n/a	3,12	84,62	12,27	n/a

188 0,5 мг/мл										
His+Prol + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	5,1	n/a	0,52	n/a	99,43	n/a	3,15	84,86	12,00	n/a
His+Prol + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	4,9	n/a	0,46	n/a	99,51	n/a	2,96	84,73	12,31	n/a

Определение стабильности при щелочном гидролизе.

Оценка стабильности при щелочном гидролизе для составов, не содержащих полоксамер 188, выполнена методом 11 с доведением до pH 8,5 и выдерживанием в течение 1 часа. До и после гидролиза определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм в капилляре методом 14, гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 13. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 13 – Результаты определения стабильности при щелочном гидролизе

Обозначение состава	Гидродина- мический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел.	Осн.	Кисл.	Δ abs
	IC	Basic 8.5 1H	IC	Δ Basic 8.5 1H	IC	Δ Basic 8.5 1H	IC			Basic 8.5 1H
His+Tre	5,5	10,5	0,47	9,82	99,49	-9,83	2,78	85,19	12,04	23,46
His+Tre + Аргинина г/х 100 мМ	7,2	10,1	0,51	9,26	99,46	-9,30	2,81	85,41	11,79	13,95
His+Tre + Глицин 100 мМ	5,6	9,4	0,47	6,14	99,49	-6,16	2,79	84,99	12,23	14,71
His+Tre + Метионин 10 мМ	5,4	n/a	0,47	10,87	99,49	-10,93	2,74	84,70	12,57	23,38
His+Prol	5	11,3	0,46	2,10	99,48	-2,08	2,78	84,01	13,21	3,05

His+Prol + Аргинина г/х 100 мМ	6,1	6,7	0,47	4,86	99,48	-4,88	2,70	85,16	12,15	6,32
His+Prol + Глицин 100 мМ	5,3	6,1	0,47	1,98	99,49	-1,96	2,94	85,17	11,90	3,74
His+Prol + Метионин 10 мМ	5,2	9,2	0,46	3,64	99,53	-3,67	2,79	84,52	12,70	6,18
Буф.р-р Китруды + Sucr	6,2	20,7	0,45	10,36	99,53	-10,45	2,71	84,59	12,71	24,21
pI Китруды	5,9	n/a	0,46	n/a	99,52	n/a	3,11	84,03	12,87	n/a
His+Tre + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	5,5	n/a	0,54	n/a	99,43	n/a	3,23	83,61	13,17	n/a
His+Tre + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	5,5	n/a	0,46	n/a	99,51	n/a	3,12	84,62	12,27	n/a
His+Prol + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	5,1	n/a	0,52	n/a	99,43	n/a	3,15	84,86	12,00	n/a
His+Prol + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	4,9	n/a	0,46	n/a	99,51	n/a	2,96	84,73	12,31	n/a

Определение стабильности при шейкировании.

Оценка стабильности при шейкировании выполнена методом 8. До и после стресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм в капилляре методом 14, гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 14. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 14 – Результаты определения стабильности при шейкировании

Обозначение состава	Гидродина- мический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел.	Осн.	Кисл.	Δ abs
	IC	SH800 96H	IC	Δ SH80 0 96H	IC	Δ SH80 0 96H	IC			SH80 0 96H

His+Tre	5,5	5,9	0,47	-0,05	99,49	0,04	2,78	85,19	12,04	0,61
His+Tre + Аргинина г/х 100 мМ	7,2	7	0,51	-0,06	99,46	0,06	2,81	85,41	11,79	0,18
His+Tre + Глицин 100 мМ	5,6	5,9	0,47	-0,04	99,49	0,03	2,79	84,99	12,23	1,03
His+Tre + Метионин 10 мМ	5,4	9,5	0,47	-0,03	99,49	0,03	2,74	84,70	12,57	2,81
His+Prol	5	4,8	0,46	-0,02	99,48	0,02	2,78	84,01	13,21	2,13
His+Prol + Аргинина г/х 100 мМ	6,1	5,9	0,47	-0,03	99,48	0,03	2,70	85,16	12,15	0,46
His+Prol + Глицин 100 мМ	5,3	4,9	0,47	-0,03	99,49	0,02	2,94	85,17	11,90	0,93
His+Prol + Метионин 10 мМ	5,2	4,9	0,46	-0,02	99,53	-0,01	2,79	84,52	12,70	0,85
Буф.р-р Китруды + Sucr	6,2	10,5	0,45	-0,02	99,53	0,01	2,71	84,59	12,71	0,04
рl Китруды	5,9	5,7	0,46	-0,02	99,52	0,02	3,11	84,03	12,87	0,13
His+Tre + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	5,5	5,5	0,54	-0,01	99,43	0,00	3,23	83,61	13,17	0,64
His+Tre + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	5,5	5,4	0,46	0,00	99,51	-0,03	3,12	84,62	12,27	0,47
His+Prol + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	5,1	4,9	0,52	-0,01	99,43	0,00	3,15	84,86	12,00	5,23
His+Prol + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	4,9	4,9	0,46	-0,02	99,51	-0,01	2,96	84,73	12,31	5,28

Определение стабильности при замораживании и оттаивании.

Оценка стабильности при замораживании и оттаивании выполнена методом 9. До и после стресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм в капилляре методом 14, гидродинамический

радиус методом б. Результаты представлены в таблице 15. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 15 – Результаты определения стабильности при замораживании и оттаивании

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел.	Осн.	Кисл.	Δ abs
	IC	FT (-20) *3	IC	Δ FT (-20) *3	IC	Δ FT (-20) *3	IC		FT (-20) *3	
His+Tre	5,5	5,9	0,47	0,18	99,49	-0,17	2,78	85,19	12,04	5,94
His+Tre + Аргинина г/х 100 мМ	7,2	7,1	0,51	0,13	99,46	-0,14	2,81	85,41	11,79	2,84
His+Tre + Глицин 100 мМ	5,6	6	0,47	0,15	99,49	-0,14	2,79	84,99	12,23	2,85
His+Tre + Метионин 10 мМ	5,4	6	0,47	0,16	99,49	-0,14	2,74	84,70	12,57	3,66
His+Prol	5	5,2	0,46	0,14	99,48	-0,12	2,78	84,01	13,21	1,93
His+Prol + Аргинина г/х 100 мМ	6,1	6	0,47	0,08	99,48	-0,08	2,70	85,16	12,15	1,84
His+Prol + Глицин 100 мМ	5,3	5,3	0,47	0,12	99,49	-0,10	2,94	85,17	11,90	3,34
His+Prol + Метионин 10 мМ	5,2	5,3	0,46	0,09	99,53	-0,13	2,79	84,52	12,70	2,04
Буф.р-р Китруды + Sucr	6,2	6,6	0,45	0,14	99,53	-0,15	2,71	84,59	12,71	2,62
pl Китруды	5,9	5,9	0,46	0,00	99,52	0,00	3,11	84,03	12,87	3,06
His+Tre + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	5,5	5,4	0,54	0,03	99,43	-0,04	3,23	83,61	13,17	4,29
His+Tre + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	5,5	5,4	0,46	0,02	99,51	-0,02	3,12	84,62	12,27	3,98

His+Prol + Полисорбат 80 0,5 мг/мл	5,1	5,2	0,52	0,02	99,43	-0,03	3,15	84,86	12,00	6,69
His+Prol + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	4,9	4,9	0,46	0,01	99,51	0,00	2,96	84,73	12,31	4,46

Среди исследуемых образцов можно выделить по стабильности следующие составы:

1. His+Tre + Глицин 100 mM	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы дигидрат	100 мг/мл
	Глицин	7,51 мг/мл
2. His+Tre + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы дигидрат	100 мг/мл
	Полоксамер 188	0,5 мг/мл
3. His+Prol	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	L-пролин	30 мг/мл
4. His+Prol + Глицин 100 mM	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	L-пролин	30 мг/мл
	Глицин	7,51 мг/мл
5. His+Prol + Глицин 100 mM + Полоксамер 188 0,5 мг/мл	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	L-пролин	30 мг/мл
	Глицин	7,51 мг/мл
	Полоксамер 188	0,5 мг/мл

Для дальнейшей разработки выбраны составы, содержащие трегалозы дигидрат, композиции трегалозы дигидрата в сочетании с глицином, а также композиции с L-пролином, а также с L-пролином в сочетании с глицином или метионином, поскольку они показали положительные результаты стабильности при стрессировании.

Во всех составах с трегалозы дигидратом отмечено большее содержание основной фракции по сравнению с L-пролином. Среди составов, содержащих трегалозы дигидрат, наилучшие результаты показал состав с глицином. Отмечено положительное влияние глицина на температуру агрегации и плавления, а также на диффузионный параметр взаимодействия. При термическом воздействии внесение глицина в состав показало незначительные улучшения. Внесение глицина в состав показало улучшения показателей чистоты и кислотно-щелочного профиля до и после стрессирования. По сравнению с образцом в составе вспомогательных веществ Китруды без добавления ПАВ, отмечено значительное увеличение температуры плавления и температуры агрегации, а также значительно меньшее изменение показателей чистоты и кислотно-щелочного профиля при кислом и щелочном гидролизах.

Среди составов, содержащих поверхностно-активные вещества, отмечено положительное влияние полксамера 188. В данных композициях наблюдалось меньшее изменение показателей чистоты и профиля заряженных форм при шейкировании и заморозке. В связи с этим, на следующий этап в качестве поверхностно-активного вещества выбран Полксамер 188.

Пример 4. Определение критических количественных факторов состава вспомогательных веществ.

Исследование проводили в формате дробного 4-факторного эксперимента с двумя уровнями и центральной точкой. В качестве количественных факторов исследовали концентрацию белка (от 10 до 40 мг/мл), pH (от 5,1 до 6,1), концентрацию осмотического агента (от 70 до 130 мг/мл), концентрацию L-глицина (от 1,5 до 15 мг/мл) и концентрацию полксамера 188 (от 0,10 до 1,0 мг/мл). Исследуемые составы перечислены в таблице 16.

Таблица 16 – Исследуемые составы

Наименование	Конц. белка, мг/мл	Буферный раствор	Конц. осмотического агента, мг/мл	Конц. L-глицин, мг/мл	Конц. Полоксамер 188 (KOLL), мг/мл
Pembro 10 His 5,1+Tre 70+Gly 15+ KOLL 1,0	10	5 mM His pH 5,1	70 Трегалозы дигидрат	15,01	1,00
Pembro 10 His 5,1+Tre 130+Gly 15+ KOLL 0,1	10	5 mM His pH 5,1	130 Трегалозы дигидрат	15,01	0,10
Pembro 40 His 5,1+Tre 70+Gly 1,5+ KOLL 1,0	40	5 mM His pH 5,1	70 Трегалозы дигидрат	1,50	1,00
Pembro 40 His 5,1+Tre 130+Gly 1,5+ KOLL 0,1	40	5 mM His pH 5,1	130 Трегалозы дигидрат	1,50	0,10
Pembro 1 25 His 5,6+Tre 100+Gly 8,25+ KOLL 0,55	25	5 mM His pH 5,6	100 Трегалозы дигидрат	8,25	0,55
Pembro 2 25 His 5,6+Tre 100+Gly 8,25+ KOLL 0,55	25	5 mM His pH 5,6	100 Трегалозы дигидрат	8,25	0,55
Pembro 40 His 6,1+Tre 70+Gly 15+ KOLL 0,1	40	5 mM His pH 6,1	70 Трегалозы дигидрат	15,01	0,10
Pembro 10 His 6,1+Tre 70+Gly 1,5+ KOLL 0,1	10	5 mM His pH 6,1	70 Трегалозы дигидрат	1,50	0,10
Pembro 40 His 6,1+Tre 130+Gly 15+ KOLL 1,0	40	5 mM His pH 6,1	130 Трегалозы дигидрат	15,01	1,00
Pembro 10 His 6,1+Tre 130+Gly 1,5+ KOLL 1,0	10	5 mM His pH 6,1	130 Трегалозы дигидрат	1,50	1,00
Pembro 25 His 5,6 +Prol 30 + Gly 8,25	25	5 mM His pH 5,6	30 L-пролин	8,25	0
Pembro 25 His 5,6 +Prol 30 + Gly 8,25 + KOLL 0,55	25	5 mM His pH 5,6	30 L-пролин	8,25	0,55

В таблице 16 под буферными растворами подразумеваются следующие составы, описанные в таблице 17.

Таблица 17 – Рецептуры буферных растворов

5 mM His, pH 5,1	L-гистидин	0,087 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,931 мг/мл
5 mM His, pH 5,6	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
5 mM His, pH 6,1	L-гистидин	0,432 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,464 мг/мл

Исследование показателей прогнозирования стабильности.

Результаты исследования температуры агрегации методом 3, температуры плавления методом 4 и параметр диффузионного взаимодействия методом 6 для выбора осмотического агента представлены в таблице 18. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 18 – Результаты исследования показателей прогнозирования стабильности

Обозначение состава	Температура плавления, °C			T агр, °C	k _D
	T нач	T1	T2		
Pembro 10 His 5,1+ Tre 70+Gly 15+ KOLL 1,0	46,9	58	68,8	66,03	3,48E-02
Pembro 10 His 5,1+ Tre 130+Gly 15+ KOLL 0,1	48,8	61,3	68,8	67,09	1,97E-02
Pembro 40 His 5,1+ Tre 70+Gly 1,5+ KOLL 1,0	46,3	58,3	67,3	64,33	1,48E-02
Pembro 40 His 5,1+ Tre 130+Gly 1,5+ KOLL 0,10	48,4	58,9	67,9	65,33	1,18E-02
Pembro 1 25 His 5,6 + Tre 100+Gly 8,25+ KOLL 0,55	49,9	61	68,5	66,6	1,70E-02
Pembro 2 25 His 5,6 + Tre 100+Gly 8,25+ KOLL 0,55	51,1	61,3	68,8	65,54	1,56E-02
Pembro 40 His 6,1+ Tre 70+Gly 15+ KOLL 0,1	53,2	64,6	нет	66,26	1,20E-02

Pembro 10 His 6,1+ Tre 70+Gly 1,5+ KOLL 0,1	53,2	64	нет	n/a	3,99E-02
Pembro 40 His 6,1+ Tre 130+Gly 15+ KOLL 1,0	53,8	65,8	68,8	66,66	1,70E-02
Pembro 10 His 6,1+ Tre 130+Gly 1,5+ KOLL 1,0	53,2	63,7	68,8	66,16	4,79E-02
Pembro 25 His 5,6 +Prol 30 + Gly 8,25	52	62,2	67,9	64,13	2,60E-02
Pembro 25 His 5,6 +Prol 30 + Gly 8,25 + KOLL 0,55	50,8	61	67,9	64,58	3,23E-02

Определение термической стабильности.

Оценка термической стабильности выполнена методом 7. До и после термостресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм в капилляре методом 14, гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 19. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 19 – Результаты определения термической стабильности

Определение стабильности при шейкировании.

Обозначение состава	Гидродина- мический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел.	Осн.	Кисл.	Δ abs
	IC	TS50 96H	IC	Δ TS50 96H	IC	Δ TS50 96H	IC			TS50 96H
Pembro 10 His 5,1+ Tre 70+Gly 15+ KOLL 1,0	4,8	4,9	0,51	0,48	99,47	-0,55	3,08	81,29	15,64	8,12
Pembro 10 His 5,1+ Tre 130+Gly 15+ KOLL 0,1	5,3	5,5	0,52	0,25	99,46	-0,30	2,44	81,33	16,24	12,40
Pembro 40 His 5,1+ Tre 70+Gly 1,5+ KOLL 1,0	3,4	3,5	0,57	1,55	99,39	-1,62	3,77	81,31	14,93	10,62
Pembro 40 His 5,1+ Tre 130+Gly	3,8	4,1	0,57	0,85	99,39	-0,92	3,09	82,03	14,88	9,60

1,5+ KOLL 0,10											
Pembro 1 25 His 5,6 + Tre 100+Gly 8,25+ KOLL 0,55	4,4	4,5	0,63	0,45	99,33	-0,50	2,84	84,05	13,11	13,83	
Pembro 2 25 His 5,6 + Tre 100+Gly 8,25+ KOLL 0,55	4,4	4,5	0,60	0,62	99,36	-0,67	2,87	84,12	13,01	12,79	
Pembro 40 His 6,1+ Tre 70+Gly 15+ KOLL 0,1	4,7	5,0	0,64	0,64	99,33	-0,71	2,63	84,03	13,34	15,98	
Pembro 10 His 6,1+ Tre 70+Gly 1,5+ KOLL 0,1	5,0	5,1	0,60	0,25	99,39	-0,28	2,85	83,68	13,47	14,08	
Pembro 40 His 6,1+ Tre 130+Gly 15+ KOLL 1,0	5,2	5,5	0,63	0,72	99,34	-0,78	2,38	84,78	12,84	21,10	
Pembro 10 His 6,1+ Tre 130+Gly 1,5+ KOLL 1,0,	5,6	5,6	0,60	0,25	99,37	-0,30	2,58	84,50	12,92	18,44	

Оценка стабильности при шейкировании выполнена методом 8. До и после стресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм в капилляре методом 14, гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 20. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 20 – Результаты определения стабильности при шейкировании

Обозначение состава	Гидродина- мический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел.	Осн.	Кисл.	Δ abs
	IC	SH800 96H	IC	Δ SH80 0 96H	IC	Δ SH80 0 96H	IC		SH80 0 96H	

Pembro 10 His 5,1+ Tre 70+Gly 15+ KOLL 1,0	4,8	4,8	0,51	0,01	99,47	-0,01	3,08	81,29	15,64	2,10
Pembro 10 His 5,1+ Tre 130+Gly 15+ KOLL 0,1	5,3	5,4	0,52	-0,01	99,46	0,01	2,44	81,33	16,24	1,08
Pembro 40 His 5,1+ Tre 70+Gly 1,5+ KOLL 1,0	3,4	3,6	0,57	0,04	99,39	-0,04	3,77	81,31	14,93	1,89
Pembro 40 His 5,1+ Tre 130+Gly 1,5+ KOLL 0,10	3,8	4,0	0,57	-0,01	99,39	0,00	3,09	82,03	14,88	3,70
Pembro 1 25 His 5,6 + Tre 100+Gly 8,25+ KOLL 0,55	4,4	4,4	0,63	-0,07	99,33	-0,02	2,84	84,05	13,11	0,60
Pembro 2 25 His 5,6 + Tre 100+Gly 8,25+ KOLL 0,55	4,4	4,4	0,60	-0,01	99,36	0,01	2,87	84,12	13,01	1,46
Pembro 40 His 6,1+ Tre 70+Gly 15+ KOLL 0,1	4,7	4,6	0,64	0,02	99,33	-0,03	2,63	84,03	13,34	0,28
Pembro 10 His 6,1+ Tre 70+Gly 1,5+ KOLL 0,1	5,0	4,9	0,60	0,01	99,39	-0,02	2,85	83,68	13,47	4,40
Pembro 40 His 6,1+ Tre 130+Gly 15+ KOLL 1,0	5,2	5,4	0,63	0,02	99,34	-0,03	2,38	84,78	12,84	1,93
Pembro 10 His 6,1+ Tre 130+Gly 1,5+ KOLL 1,0	5,6	5,5	0,60	0,00	99,37	0,00	2,58	84,50	12,92	2,92

Определение стабильности при замораживании и оттаивании.

Оценка стабильности при замораживании и оттаивании выполнена методом 9. До и после стресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 60

13, профиль заряженных форм в капилляре методом 14, гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 21. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 21 – Результаты определения стабильности при замораживании и оттаивании

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел.	Осн.	Кисл.	Δ abs
	IC	FT (-20) *3	IC	Δ FT (-20) *3	IC	Δ FT (-20) *3	IC			FT (-20) *3
Pembro 10 His 5,1+ Tre 70+Gly 15+ KOLL 1,0	4,8	4,8	0,51	0,03	99,47	-0,03	3,08	81,29	15,64	1,56
Pembro 10 His 5,1+ Tre 130+Gly 15+ KOLL 0,1	5,3	5,3	0,52	0,02	99,46	-0,02	2,44	81,33	16,24	3,43
Pembro 40 His 5,1+ Tre 70+Gly 1,5+ KOLL 1,0	3,4	3,4	0,57	0,01	99,39	-0,01	3,77	81,31	14,93	1,90
Pembro 40 His 5,1+ Tre 130+Gly 1,5+ KOLL 0,10	3,8	3,8	0,57	0,05	99,39	-0,06	3,09	82,03	14,88	2,28
Pembro 1 25 His 5,6 + Tre 100+Gly 8,25+ KOLL 0,55	4,4	4,4	0,63	0,01	99,33	0,00	2,84	84,05	13,11	3,19
Pembro 2 25 His 5,6 + Tre 100+Gly 8,25+ KOLL 0,55	4,4	4,4	0,60	0,02	99,36	-0,01	2,87	84,12	13,01	1,14
Pembro 40 His 6,1+ Tre 70+Gly 15+ KOLL 0,1	4,7	4,7	0,64	0,02	99,33	-0,03	2,63	84,03	13,34	0,82
Pembro 10 His 6,1+ Tre	5	5	0,60	0,06	99,39	-0,07	2,85	83,68	13,47	0,50

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				Профиль заряженных форм			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Щел.	Осн.	Кисл.	Δ abs
	IC	FT (-20) *3	IC	Δ FT (-20) *3	IC	Δ FT (-20) *3	IC		FT (-20) *3	
70+Gly 1,5+ KOLL 0,1										
Pembro 40 His 6,1+ Tre 130+Gly 15+ KOLL 1,0	5,2	5,2	0,63	0,06	99,34	-0,05	2,38	84,78	12,84	2,70
Pembro 10 His 6,1+ Tre 130+Gly 1,5+ KOLL 1,0	5,6	5,9	0,60	0,04	99,37	-0,05	2,58	84,50	12,92	1,12

По полученным результатам построили модель в ПО Minitab. Концентрации L-глицина и полоксамера 188 не оказывают статистически значимого влияния на стабильность пембролизумаба. По результатам оптимизации, рекомендуемая концентрация L-глицина 15 мг/мл, рекомендуемая концентрация полоксамера 188 1,0 мг/мл, рекомендуемая концентрация трегалозы дигидрата 84,5 мг/мл. Однако для обеспечения физиологичной осмоляльности композиции содержание L-глицина снизили до 1,5 мг/мл, а трегалозы дигидрата снизили до 80 мг/мл. Буферный раствор, его концентрация и pH были выбраны ранее, результаты приведены в Примере 1. В данном примере подтвердилось их статистически значимое влияние на стабильность пембролизумаба. При термическом воздействии поверхности-активные вещества могут вызывать появление артефактных высокомолекулярных примесей. При исключении термического воздействия из модели можно сделать вывод, что увеличение концентрации полоксамера 188 положительно влияет на стабильность пембролизумаба. Согласно полученным результатам оптимальная концентрация полоксамера 188 составляет 1,0 мг/мл.

Таким образом, финальный выбранный состав:

Пембролизумаб	1,5–40 мг/мл
L-гистидин	0,221 мг/мл
L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
Трегалозы дигидрат	80 мг/мл
Глицин	1,5 мг/мл
Полоксамер 188	1,0 мг/мл

Пример 5. Определение стабильности финального состава в стресс-условиях

Для проведения стресс-стабильности были выбраны финальный состав Пембролизумаба и состав вспомогательных веществ Китруды. Исследуемые составы представлены в таблице 22. Фармацевтические композиции, содержащие пембролизумаб в исследуемых составах, были получены в соответствии с методикой 2.

Таблица 22 – Исследуемые составы

Pembro	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы д/г	80,0 мг/мл
	Глицин	1,5 мг/мл
	Полоксамер 188	1,0 мг/мл
pl Китруды	Пембролизумаб	1,5–30 мг/мл
	L-гистидин	0,3 мг/мл
	L-гистидина г/х м/г	1,7 мг/мл
	Сахароза	70 мг/мл
	Полисорбат 80	0,2 мг/мл

Определение термической стабильности.

Оценка термической стабильности выполнена методом 7 в течение 10 дней. До и после термостресса определены чистота методом Э ВЭЖХ (метод 13), профиль заряженных форм методом ИО ВЭЖХ (метод 15),

содержание продуктов окисления методом ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий (метод 18), гидродинамический радиус методом 5. Результаты представлены в таблице 23. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 23 – Результаты определения термической стабильности

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Окисл. формы, пик 1+2		Окисл. формы, пик 3.	
	IC	TS50	IC	Δ TS50	IC	Δ TS50	IC	Δ TS50	IC	Δ TS50
Pembro	4,2	4,7	0,15	0,02	99,85	-0,18	7,9	0,74	0	0,50
pl Китруды	5,0	6,1	0,14	0,07	99,86	-0,25	6,22	12,15	0	1,13
Обозначение состава	Профиль заряженных форм, ИО ВЭЖХ									
	Кисл., %				Осн., %			Щел., %		
	IC	Δ TS50		IC	Δ TS50		IC	Δ TS50		
Pembro	13,81	21,92		73,97	-22,13		12,22	0,21		
pl Китруды	15,59	22,36		72,79	-23,74		11,62	1,38		

Определение стабильности при шейкировании.

Оценка стабильности при шейкировании выполнена методом 8. До и после шейкирования определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм методом ИО ВЭЖХ (метод 15), содержание продуктов окисления методом ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий (метод 18), гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 24. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 24 – Результаты определения стабильности при шейкировании

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ		ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий	
			Агрегаты, %	Мономер, %	Окисл. формы, пик 1+2	Окисл. формы, пик 3.

	IC	SH800	IC	Δ SH800	IC	Δ SH800	IC	Δ SH800	IC	Δ SH800
Pembro	4,2	0,1	0,15	0,04	99,85	-0,04	7,9	n/a	0	n/a
pl Китруды	5,0	0,0	0,14	0,04	99,86	-0,04	6,22	n/a	0	n/a
Обозначение состава	Профиль заряженных форм, ИО ВЭЖХ									
	Кисл., %				Осн., %			Щел., %		
	IC	Δ SH800	IC	Δ SH800	IC	Δ SH800	IC	Δ SH800	IC	Δ SH800
Pembro	13,81	0,18	73,97	-0,16	12,22	-0,02				
pl Китруды	15,59	-1,28	72,79	1,65	11,62	-0,36				

Определение стабильности при замораживании и оттаивании.

Оценка стабильности при замораживании и оттаивании выполнена методом 9. До и после стресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм методом ИО ВЭЖХ (метод 15), содержание продуктов окисления методом ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий (метод 18), гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 25. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 25 – Результаты определения стабильности при замораживании и оттаивании

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Окисл. формы, пик 1+2		Окисл. формы, пик 3.	
	IC	FT(-20)	IC	Δ FT (-20)	IC	Δ FT (-20)	IC	Δ FT (-20)	IC	Δ FT (-20)
Pembro	4,2	-0,1	0,15	-0,01	99,85	0,01	7,9	n/a	0	n/a
pl Китруды	5,0	-0,1	0,14	0,01	99,86	-0,01	6,22	n/a	0	n/a
Обозначение состава	Профиль заряженных форм, ИО ВЭЖХ									
	Кисл., %				Осн., %			Щел., %		
	IC	Δ FT(-20)*3	IC	Δ FT(-20)*3	IC	Δ FT(-20)*3	IC	Δ FT(-20)*3	IC	Δ FT(-20)*3
Pembro	13,81	-0,05	73,97	0,06	12,22	-0,01				

pl Китруды	15,59	-0,09	72,79	0,16	11,62	-0,07
------------	-------	-------	-------	------	-------	-------

Определение стабильности при кислотном гидролизе.

Оценка стабильности при кислотном гидролизе выполнена методом 9. До и после стресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм методом ИО ВЭЖХ (метод 15), содержание продуктов окисления методом ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий (метод 18), гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 26. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 26 – Результаты определения стабильности при кислотном гидролизе

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Окисл. формы, пик 1+2		Окисл. формы, пик 3.	
	IC	Acid pH 4,0	IC	Δ Acid pH 4,0	IC	Δ Acid pH 4,0	IC	Δ Acid pH 4,0	IC	Δ Acid pH 4,0
Pembro	4,2	2,00	0,15	0,11	99,85	-0,11	7,9	0,52	0	0,00
pl Китруды	5,0	1,33	0,14	0,12	99,86	-0,12	6,22	0,19	0	0,00
Обозначение состава	Профиль заряженных форм, ИО ВЭЖХ									
	Кисл., %				Осн., %				Щел., %	
	IC	Δ Acid pH 4,0	IC	Δ Acid pH 4,0	IC	Δ Acid pH 4,0	IC	Δ Acid pH 4,0	IC	Δ Acid pH 4,0
Pembro	13,81	-0,11	73,97	0,20	12,22	-0,09				
pl Китруды	15,59	-0,17	72,79	0,22	11,62	-0,04				

Определение стабильности при щелочном гидролизе.

Оценка стабильности при щелочном гидролизе выполнена методом 9. До и после стресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм методом ИО ВЭЖХ (метод 15), содержание продуктов окисления методом ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий (метод

18), гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 27. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 27 – Результаты определения стабильности при щелочном гидролизе

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Окисл. формы, пик 1+2		Окисл. формы, пик 3.	
	IC	Basic pH 8,0	IC	Δ Basic pH 8,0	IC	Δ Basic pH 8,0	IC	Δ Basic pH 8,0	IC	Δ Basic pH 8,0
Pembro	4,2	2,2	0,15	0,18	99,85	-0,24	7,9	0,18	0	0,00
pl Китруды	5,0	2,1	0,14	0,47	99,86	-0,47	6,22	0,11	0	0,00
Обозначение состава	Профиль заряженных форм, ИО ВЭЖХ									
	Кисл., %		Осн., %		Щел., %					
	IC	Δ Basic pH 8,0	IC	Δ Basic pH 8,0	IC	Δ Basic pH 8,0				
Pembro	13,81	0,28	73,97	-0,07	12,22	-0,20				
pl Китруды	15,59	0,35	72,79	0,06	11,62	-0,42				

Определение стабильности при окислении.

Оценка стабильности при окислении выполнена методом 9. До и после стресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм методом ИО ВЭЖХ (метод 15), содержание продуктов окисления методом ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий (метод 18), гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 28. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 28 – Результаты определения стабильности при окислении

Обозначение состава	Гидродинамический радиус, нм	Чистота, Э ВЭЖХ		ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий	
		Агрегаты, %	Мономер, %	Окисл. формы, пик 1+2	Окисл. формы, пик 3.

	IC	Ox 0,1%	IC	Δ Ox 0,1%	IC	Δ Ox 0,1 %	IC	Δ Oх 0,1%	IC	Δ Oх 0,1%
Pembro	4,2	2,2	0,31	-0,02	99,63	0,02	7,8 9	Не подлежи т разметке	0	Не подлежи т разметке
pl Китруды	5,0	2,1	0,30	-0,01	99,65	0,00	7,1 2		0	
Обозначение состава	Профиль заряженных форм, ИО ВЭЖХ									
	Кисл., %				Осн., %			Щел., %		
	IC	Δ Oх 0,1%		IC	Δ Oх 0,1%		IC	Δ Oх 0,1%		
Pembro	13,41	-3,07		74,75	-27,21		11,85	30,28		
pl Китруды	15,34	-3,74		73,76	-29,43		10,91	33,17		

Определение стабильности при фотовоздействии.

Оценка стабильности при окислении выполнена методом 9. До и после стресса определены чистота методом Э ВЭЖХ методом 13, профиль заряженных форм методом ИО ВЭЖХ (метод 15), содержание продуктов окисления методом ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий (метод 18), гидродинамический радиус методом 6. Результаты представлены в таблице 29. Лучшие результаты имеют более светлый оттенок окраски.

Таблица 29 – Результаты определения стабильности при фотовоздействии

Обозначение состава	Гидродина- мический радиус, нм		Чистота, Э ВЭЖХ				ВЭЖХ гидрофобных взаимодействий			
			Агрегаты, %		Мономер, %		Окисл. формы, пик 1+2		Окисл. формы, пик 3.	
	IC	UV	IC	Δ UV	IC	Δ UV	IC	Δ UV	IC	Δ UV
Pembro	4,3	0,1	0,16	0,17	99,84	-0,16	8,60	1,75	0	0
pl Китруды	5,0	0,1	0,17	0,18	99,83	-0,18	6,33	5,59	0	0
Обозначение состава	Профиль заряженных форм, ИО ВЭЖХ									
	Кисл., %				Осн., %			Щел., %		
	IC	Δ UV		IC	Δ UV		IC	Δ UV		
Pembro	12,31	3,03		75,71	-6,10		11,98	3,07		

pI Китруды	14,00	2,39	74,78	-6,79	11,23	4,39
------------	-------	------	-------	-------	-------	------

По результатам стресс-стабильности состав вспомогательных веществ Пембролизумаба по сравнению с составом Китруды показал меньшие изменение показателей качества при термическом воздействии, а именно, меньшее изменение гидродинамического радиуса, меньший прирост агрегатов и изменения содержания мономера, значительно меньшую склонность к приросту окисленных форм и меньшее изменение профиля заряженных форм.

При шейкировании и заморозке наблюдается меньшее изменение профиля заряженных форм после стрессирования.

В свою очередь, при кислом гидролизе отмечен меньший прирост агрегатов и изменение содержания мономера, а также меньшее изменение содержания основной фракции. При щелочном гидролизе белок в составе Пембролизумаба менее склонен к образованию агрегатов, изменению содержания мономера и изменению профиля заряженных форм.

При фотовоздействии наблюдали значительно меньшую склонность к окислению по сравнению с составом вспомогательных веществ Китруды, а также меньшее изменение содержания мономера, меньший прирост агрегатов и меньшее изменение профиля заряженных форм.

Пример 6. Определение стабильности при ускоренном хранении при температуре 37 ± 2 °C.

Для предварительного подтверждения стабильности выбранного состава проведено ускоренное хранение при температуре 37 ± 2 °C.

Фармацевтические композиции в диапазоне концентрации белка (от 25 до 50 мг/мл), pH (от 5,1 до 6,1), концентрации трегалозы дигидрата (от 70 до 90 мг/мл), концентрации глицина (от 1,0 до 2,0 мг/мл) и концентрации полксамера 188 (от 0,8 до 1,2 мг/мл) приготовлены методом 1 и заложены на исследование стабильности при температуре 37 ± 2 °C.

Исследуемые составы представлены в таблице 30.

Таблица 30 – Исследуемые составы

Pembro 25 мг/мл сост1	Пембролизумаб	25,0 мг/мл
	L-гистидин	0,087 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,931 мг/мл
	Трегалозы д/г	90 мг/мл
	Глицин	1,0 мг/мл
	Полоксамер 188	0,8 мг/мл
Pembro 25 мг/мл сост2	Пембролизумаб	25,0 мг/мл
	L-гистидин	0,087 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,931 мг/мл
	Трегалозы д/г	90 мг/мл
	Глицин	2,0 мг/мл
	Полоксамер 188	1,2 мг/мл
Pembro 25 мг/мл сост3	Пембролизумаб	25,0 мг/мл
	L-гистидин	0,087 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,931 мг/мл
	Трегалозы д/г	70 мг/мл
	Глицин	2,0 мг/мл
	Полоксамер 188	0,8 мг/мл
Pembro 25 мг/мл сост4	Пембролизумаб	25,0 мг/мл
	L-гистидин	0,087 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,931 мг/мл
	Трегалозы д/г	70 мг/мл
	Глицин	1,0 мг/мл
	Полоксамер 188	1,2 мг/мл
Pembro 50 мг/мл сост5	Пембролизумаб	50,0 мг/мл
	L-гистидин	0,087 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,931 мг/мл
	Трегалозы д/г	90 мг/мл

	Глицин	2,0 мг/мл
	Полоксамер 188	0,8 мг/мл
Pembro 50 мг/мл сост6	Пембролизумаб	50,0 мг/мл
	L-гистидин	0,087 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,931 мг/мл
	Трегалозы д/г	70 мг/мл
	Глицин	1,0 мг/мл
	Полоксамер 188	0,8 мг/мл
Pembro 50 мг/мл сост7	Пембролизумаб	50,0 мг/мл
	L-гистидин	0,087 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,931 мг/мл
	Трегалозы д/г	90 мг/мл
	Глицин	1,0 мг/мл
	Полоксамер 188	1,2 мг/мл
Pembro 50 мг/мл сост8	Пембролизумаб	50,0 мг/мл
	L-гистидин	0,087 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,931 мг/мл
	Трегалозы д/г	70 мг/мл
	Глицин	2,0 мг/мл
	Полоксамер 188	1,2 мг/мл
Pembro 37,5 мг/мл сост9	Пембролизумаб	37,5 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы д/г	80,0 мг/мл
	Глицин	1,5 мг/мл
	Полоксамер 188	1,0 мг/мл
Pembro 37,5 мг/мл сост10	Пембролизумаб	37,5 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл

	Трегалозы д/г	80,0 мг/мл
	Глицин	1,5 мг/мл
	Полоксамер 188	1,0 мг/мл
Rembro 25 мг/мл сост11	Пембролизумаб	25,0 мг/мл
	L-гистидин	0,432 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,464 мг/мл
	Трегалозы д/г	70,0 мг/мл
	Глицин	1,0 мг/мл
	Полоксамер 188	0,8 мг/мл
Rembro 25 мг/мл сост12	Пембролизумаб	25,0 мг/мл
	L-гистидин	0,432 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,464 мг/мл
	Трегалозы д/г	90,0 мг/мл
	Глицин	2,0 мг/мл
	Полоксамер 188	0,8 мг/мл
Rembro 25 мг/мл сост13	Пембролизумаб	25,0 мг/мл
	L-гистидин	0,432 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,464 мг/мл
	Трегалозы д/г	70,0 мг/мл
	Глицин	2,0 мг/мл
	Полоксамер 188	1,2 мг/мл
Rembro 25 мг/мл сост14	Пембролизумаб	25,0 мг/мл
	L-гистидин	0,432 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,464 мг/мл
	Трегалозы д/г	90,0 мг/мл
	Глицин	1,0 мг/мл
	Полоксамер 188	1,2 мг/мл
Rembro 50 мг/мл сост15	Пембролизумаб	50,0 мг/мл
	L-гистидин	0,432 мг/мл

	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,464 мг/мл
	Трегалозы д/г	90,0 мг/мл
	Глицин	1,0 мг/мл
	Полоксамер 188	0,8 мг/мл
Rembro 50 мг/мл сост16	Пембролизумаб	50,0 мг/мл
	L-гистидин	0,432 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,464 мг/мл
	Трегалозы д/г	70,0 мг/мл
	Глицин	1,0 мг/мл
Rembro 50 мг/мл сост17	Пембролизумаб	50,0 мг/мл
	L-гистидин	0,432 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,464 мг/мл
	Трегалозы д/г	90,0 мг/мл
	Глицин	2,0 мг/мл
Rembro 50 мг/мл сост18	Пембролизумаб	50,0 мг/мл
	L-гистидин	0,432 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,464 мг/мл
	Трегалозы д/г	70,0 мг/мл
	Глицин	2,0 мг/мл
Rembro 25 мг/мл сост19	Пембролизумаб	25,0 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы д/г	80,0 мг/мл
	Глицин	1,5 мг/мл
	Полоксамер 188	1,0 мг/мл

Pembro 50 мг/мл сост20	Пембролизумаб	50,0 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы д/г	80,0 мг/мл
	Глицин	1,5 мг/мл
	Полоксамер 188	1,0 мг/мл

Ускоренное хранение.

Фармацевтические композиции, содержащие белок в концентрации 25, 50 и 37,5 мг/мл приготовлены методом диафильтрации согласно методике 1 и заложены на ускоренное хранение при температуре 37 ± 2 °С в соответствии с методикой 8. Результаты исследования представлены в таблице 31.

Таблица 31 – Результаты исследования стабильности при температуре 37 ± 2 °С

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	2 недели	4 недели	Изменение
1. Pembro 25 мг/мл сост1 pH5,1 90Tre+ 1Gly+0,8Koll	Концентрация, мг/мл	24,30	n/a	24,30	n/a
	pH	5,23	n/a	5,23	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	311	n/a	302	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,39	0,45	0,78	0,39
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,59	99,46	99,16	-0,43
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,05	19,58	24,65	8,60
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	69,70	65,81	58,77	-10,93
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	14,25	14,61	16,58	2,33
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	7,78	21,86	n/a
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,74	97,52	97,87	0,13
	Содержание мономера, КЭФ неред. усл.	95,81	93,42	93,02	-2,79

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	2	4	Изменение
			недел и	недел и	
	Спец. активность	115	n/a	109	-6
2. Pembro 25 мг/мл сост2 pH5,1 90Tre+ 2Gly+1,2Koll	Концентрация, мг/мл	24,80	n/a	23,90	n/a
	pH	5,23	n/a	5,31	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	325	n/a	317	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,38	0,44	0,78	0,40
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,60	99,47	99,12	-0,48
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,08	19,59	24,85	8,77
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	69,76	66,08	59,24	-10,52
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	14,16	14,33	15,91	1,75
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	7,36	21,04	n/a
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,63	97,64	97,75	0,12
	Содержание мономера, КЭФ неред. усл.	96,00	93,51	93,10	-2,90
	Спец. активность	109	n/a	112	3
	3. Pembro 25 мг/мл сост3 pH5,1 70Tre+ 2Gly+0,8Koll	Концентрация, мг/мл	24,70	n/a	24,60
pH		5,35	n/a	5,35	n/a
Осмоляльность, мОсм/кг		247	n/a	246,00	n/a
Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %		0,39	0,46	0,73	0,34
Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %		99,59	99,46	99,20	-0,39
Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %		16,13	19,56	24,88	8,75
Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %		70,15	66,06	59,25	-10,90
Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %		13,73	14,38	15,87	2,14
Абсолютное изменение профиля заряженных форм		n/a	8,18	21,80	n/a
Содержание мономера, КЭФ ред. усл.		97,67	97,78	97,8	0,13
Содержание мономера, КЭФ неред. усл.		95,87	93,63	92,82	-3,05
Спец. активность		100	n/a	104	4

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	2 недели	4 недели	Изменение
4. Rembro 25 мг/мл сост4 pH5,1 70Tre+ 1Gly+1,2Koll	Концентрация, мг/мл	25,10	n/a	24,30	n/a
	pH	5,23	n/a	5,19	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	226	n/a	233	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,40	0,45	0,77	0,37
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,58	99,49	99,14	-0,44
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,26	19,45	24,81	8,55
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	70,08	66,38	59,39	-10,69
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	13,66	14,18	15,80	2,14
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	7,41	21,37	n/a
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,57	97,48	97,81	0,24
	Содержание мономера, КЭФ неред. усл.	96,29	93,37	93,13	-3,16
	Спец. активность	108	n/a	93	-15
5. Rembro 50 мг/мл сост5 pH5,1 90Tre+ 2Gly+0,8Koll	Концентрация, мг/мл	49,90	n/a	48,90	n/a
	pH	5,30	n/a	5,22	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	329	n/a	347	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,43	0,54	0,94	0,51
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,55	99,40	98,95	-0,60
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,20	19,76	25,11	8,91
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	70,17	66,25	59,24	-10,93
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	13,63	13,99	15,64	2,01
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	7,83	21,84	n/a
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,64	97,53	97,54	-0,10
	Содержание мономера, КЭФ неред. усл.	96,27	93,72	93,13	-3,14
	Спец. активность	116	n/a	104	-12
6. Rembro 50 мг/мл сост6	Концентрация, мг/мл	49,90	n/a	48,60	n/a

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	2 недели	4 недели	Изменение	
pH5,1 70Tre+ 1Gly+0,8Koll	pH	5,29	n/a	5,35	n/a	
	Осмоляльность, мОсм/кг	246	n/a	237	n/a	
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,44	0,64	0,96	0,52	
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,53	99,31	98,96	-0,57	
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,16	19,57	24,78	8,62	
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	69,51	66,07	58,96	-10,55	
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	14,32	14,36	16,26	1,94	
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	6,89	21,11	n/a	
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,47	97,51	97,79	0,32	
	Содержание мономера, КЭФ неред. усл.	96,36	93,59	92,94	-3,42	
	Спец. активность	91	n/a	121	30	
	7. Pembro 50 мг/мл сост7 pH5,1 90Tre+ 1Gly+1,2Koll	Концентрация, мг/мл	48,70	n/a	48,20	n/a
		pH	5,29	n/a	5,26	n/a
Осмоляльность, мОсм/кг		304	n/a	309	n/a	
Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %		0,42	0,59	1,03	0,61	
Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %		99,56	99,36	98,88	-0,68	
Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %		16,24	19,74	25,16	8,92	
Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %		69,95	66,92	58,90	-11,05	
Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %		13,82	13,34	15,95	2,13	
Абсолютное изменение профиля заряженных форм		n/a	7,01	22,10	n/a	
Содержание мономера, КЭФ ред. усл.		97,48	97,41	97,53	0,05	
Содержание мономера, КЭФ неред. усл.		96,32	93,76	92,86	-3,46	
Спец. активность		91	n/a	92	1	
8. Pembro 50 мг/мл сост8 pH5,1 70Tre+ 2Gly+1,2Koll		Концентрация, мг/мл	49,60	n/a	47,40	n/a
	pH	5,29	n/a	5,43	n/a	

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	2	4	Изменение
			недел и	недел и	
	Осмоляльность, мОсм/кг	261	n/a	253	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,42	0,63	1,03	0,61
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,53	99,30	98,89	-0,64
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,44	19,73	25,46	9,02
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	70,67	66,47	59,57	-11,10
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	12,89	13,80	14,98	2,09
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	8,40	22,21	n/a
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,41	97,42	97,49	0,08
	Содержание мономера, КЭФ неред. усл.	96,35	93,82	92,85	-3,50
	Спец. активность	111	n/a	90	-21
	9. Pembro 37,5 мг/мл сост9 pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll	Концентрация, мг/мл	38,80	n/a	38,10
pH		5,63	n/a	5,60	n/a
Осмоляльность, мОсм/кг		285	n/a	276	n/a
Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %		0,45	0,56	0,97	0,52
Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %		99,53	99,38	98,95	-0,58
Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %		16,50	20,05	26,68	10,18
Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %		69,74	66,34	59,32	-10,42
Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %		13,76	13,61	14,01	0,25
Абсолютное изменение профиля заряженных форм		n/a	7,10	20,84	n/a
Содержание мономера, КЭФ ред. усл.		97,70	97,39	97,65	-0,05
Содержание мономера, КЭФ неред. усл.		96,25	93,88	92,85	-3,40
Спец. активность	100	n/a	86	-14	
10. Pembro 37,5 мг/мл сост10 pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll	Концентрация, мг/мл	38,00	n/a	37,10	n/a
	pH	5,67	n/a	5,59	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	288	n/a	276	n/a

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	2 недели	4 недели	Изменение
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,45	0,61	0,96	0,51
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,53	99,34	98,98	-0,55
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,38	20,17	26,58	10,20
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	70,35	67,01	58,80	-11,55
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	13,27	12,82	14,62	1,35
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	7,59	23,11	n/a
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,62	97,58	97,61	-0,01
	Содержание мономера, КЭФ неред. усл.	96,38	93,69	93,36	-3,02
	Спец. активность	114	n/a	83	-31
	11. Pembro 25 мг/мл сост11 pH6.1 70Tre+ 1Gly+0,8Koll	Концентрация, мг/мл	25,50	n/a	25,20
pH		6,05	n/a	5,99	n/a
Осмоляльность, мОсм/кг		239	n/a	241	n/a
Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %		0,49	0,60	1,00	0,51
Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %		99,48	99,33	98,93	-0,55
Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %		16,30	21,95	28,93	12,63
Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %		68,83	66,24	56,92	-11,91
Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %		14,88	11,81	14,16	-0,72
Абсолютное изменение профиля заряженных форм		n/a	11,31	25,26	n/a
Содержание мономера, КЭФ ред. усл.		97,62	97,4	97,52	-0,10
Содержание мономера, КЭФ неред. усл.		96,26	93,58	92,78	-3,48
Спец. активность	108	n/a	95	-13	
12. Pembro 25 мг/мл сост12 pH6,1 90Tre+ 2Gly+0,8Koll	Концентрация, мг/мл	27,00	n/a	26,10	n/a
	pH	6,04	n/a	6,03	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	324	n/a	313	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,47	0,61	0,99	0,52

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	2 недели	4 недели	Изменение
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,50	99,35	98,93	-0,57
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,45	22,00	29,67	13,22
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	69,37	65,53	56,93	-12,44
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	14,18	12,47	13,40	-0,78
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	11,10	26,43	n/a
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,42	97,19	97,32	-0,10
	Содержание мономера, КЭФ перед. усл.	96,30	93,53	92,51	-3,79
	Спец. активность	141	n/a	91	-50
	13. Pembro 25 мг/мл сост13 pH6,1 70Tre+ 2Gly+1,2Koll	Концентрация, мг/мл	26,80	n/a	26,20
pH		6,05	n/a	6,02	n/a
Осмоляльность, мОсм/кг		252	n/a	240	n/a
Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %		0,48	0,59	1,01	0,53
Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %		99,51	99,37	98,92	-0,59
Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %		16,70	21,71	29,45	12,75
Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %		69,76	65,74	57,52	-12,24
Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %		13,54	12,55	13,04	-0,50
Абсолютное изменение профиля заряженных форм		n/a	10,03	25,50	n/a
Содержание мономера, КЭФ ред. усл.		97,55	97,41	97,3	-0,25
Содержание мономера, КЭФ перед. усл.		96,37	93,61	92,78	-3,59
Спец. активность		93	n/a	125	32
14. Pembro 25 мг/мл сост14 pH6,1 90Tre+ 1Gly+1,2Koll	Концентрация, мг/мл	27,00	n/a	26,10	n/a
	pH	6,02	n/a	6,06	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	304	n/a	288	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,48	0,62	1,03	0,55
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,50	99,32	98,90	-0,60

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	2 недели	4 недели	Изменение
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,54	21,77	29,19	12,65
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	69,68	65,89	57,49	-12,19
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	13,78	12,34	13,33	-0,45
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	10,45	25,30	n/a
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,71	97,08	97,54	-0,17
	Содержание мономера, КЭФ перед. усл.	96,10	93,82	92,70	-3,40
	Спец. активность	108	n/a	117	9
15. Pembro 50 мг/мл сост15 pH6,1 90Tre+ 1Gly+0,8Koll	Концентрация, мг/мл	50,80	n/a	52,20	n/a
	pH	6,09	n/a	6,22	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	325	n/a	319	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,59	0,79	1,38	0,79
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,39	99,16	98,55	-0,84
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,54	21,86	29,76	13,22
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	70,34	66,38	57,18	-13,16
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	13,12	11,76	13,06	-0,06
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	10,64	26,43	n/a
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,62	97,36	97,33	-0,29
	Содержание мономера, КЭФ перед. усл.	96,33	96,50	92,83	-3,50
	Спец. активность	96	n/a	106	10
	16. Pembro 50 мг/мл сост16 pH6,1 70Tre+ 1Gly+1,2Koll	Концентрация, мг/мл	53,80	n/a	51,40
pH		6,07	n/a	6,05	n/a
Осмоляльность, мОсм/кг		252	n/a	234	n/a
Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %		0,54	0,81	1,28	0,74
Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %		99,43	99,15	98,65	-0,78
Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %		16,33	22,08	29,45	13,12

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	2	4	Изменение
			недел и	недел и	
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	69,70	66,38	57,25	-12,45
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	13,97	11,55	13,30	-0,67
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	11,50	26,25	n/a
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,57	97,39	97,52	-0,05
	Содержание мономера, КЭФ неред. усл.	95,15	96,30	92,92	-2,23
	Спец. активность	116	n/a	103	-13
	17. Rembro 50 мг/мл сост17 pH6,1 90Tre+ 2Gly+1,2Koll	Концентрация, мг/мл	52,90	n/a	52,50
pH		6,10	n/a	6,08	n/a
Осмоляльность, мОсм/кг		336	n/a	326	n/a
Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %		0,58	0,75	1,35	0,77
Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %		99,34	99,20	98,58	-0,76
Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %		16,54	22,18	29,86	13,32
Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %		70,27	65,86	56,95	-13,32
Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %		13,19	11,97	13,19	0,00
Абсолютное изменение профиля заряженных форм		n/a	11,27	26,64	n/a
Содержание мономера, КЭФ ред. усл.		97,66	97,33	97,33	-0,33
Содержание мономера, КЭФ неред. усл.		96,17	96,31	93,02	-3,15
Спец. активность		91	n/a	106	15
18. Rembro 50 мг/мл сост 18 pH6,1 70Tre+ 2Gly+0,8Koll		Концентрация, мг/мл	52,10	n/a	51,20
	pH	6,10	n/a	6,07	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	269	n/a	247	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,53	0,79	1,52	0,99
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,45	99,15	98,41	-1,04
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,59	22,11	30,11	13,52
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	70,19	65,63	56,76	-13,43

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	2 недели	4 недели	Изменение
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	13,22	12,26	13,13	-0,09
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	11,04	27,04	n/a
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,65	97,51	97,40	-0,25
	Содержание мономера, КЭФ перед. усл.	94,04	96,32	93,03	-1,01
	Спец. активность	103	n/a	97	-6
	19. Pembro 25 мг/мл сост19 pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll IC	Концентрация, мг/мл	26,00	n/a	25,40
pH		5,59	n/a	5,55	n/a
Осмоляльность, мОсм/кг		281	n/a	260	n/a
Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %		0,43	0,53	0,89	0,46
Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %		99,55	99,43	99,01	-0,54
Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %		16,08	19,88	26,16	10,08
Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %		70,71	66,90	58,73	-11,98
Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %		13,21	13,22	15,11	1,90
Абсолютное изменение профиля заряженных форм		n/a	7,62	23,96	n/a
Содержание мономера, КЭФ ред. усл.		97,67	97,04	97,76	0,09
Содержание мономера, КЭФ перед. усл.		93,98	96,50	93,22	-0,76
Спец. активность		100	n/a	104	4
20. Pembro 50 мг/мл состав 20 pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll		Концентрация, мг/мл	51,70	n/a	51,30
	pH	5,65	n/a	5,61	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	287	n/a	282	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,50	0,64	1,08	0,58
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,48	99,32	98,82	-0,66
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,57	20,04	26,43	9,86
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	70,47	66,97	59,07	-11,40
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	12,97	13,00	14,51	1,54

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	2 недели	4 недели	Изменение
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	7,00	22,80	n/a
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,71	97,07	97,55	-0,16
	Содержание мономера, КЭФ перед. усл.	94,18	96,36	93,60	-0,58
	Спец. активность	97	n/a	92,00	-5

Во всех исследуемых составах отмечено допустимое изменение показателей качества (чистоты, определенной методами Э ВЭЖХ, КЭФ в редуцирующих и нередуцирующих условиях, профиля заряженных форм и специфической активности), что было подтверждено построением пространства Design Space с помощью ПО MODDE. По результатам построенного пространства эксперимента, отражающего влияние факторов (рН буферного раствора и содержание компонентов вспомогательных веществ) на отклики (показатели качества) фармацевтическая композиция стабильна в заявленном диапазоне концентраций, рН и вспомогательных веществ при ускоренном хранении при $37 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 4 недель.

Пример 7. Определение стабильности при длительном ускоренном хранении.

Для подтверждения стабильности выбранного состава проведено ускоренное хранение при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Фармацевтические композиции в диапазоне концентрации белка (от 25 до 50 мг/мл), рН (от 5,1 до 6,1), концентрации трегалозы дигидрата (от 70 до 90 мг/мл), концентрации глицина (от 1,0 до 2,0 мг/мл) и концентрации Полоксамера 188 (от 0,8 до 1,2 мг/мл) приготовлены методом 1 и заложены на исследование стабильности при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$. При этом из всех композиций выбраны наиболее критические случаи, при наименьшем и наибольшем содержании вспомогательных веществ и максимальном

содержании белка, а также составы с содержанием вспомогательных веществ в центральной точке исследуемого диапазона.

Исследуемые составы представлены в таблице 32.

Таблица 32 – Исследуемые составы

Обозначение	Состав	
Pembro 50 мг/мл сост6	Пембролизумаб	50,0 мг/мл
	L-гистидин	0,087 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,931 мг/мл
	Трегалозы д/г	70 мг/мл
	Глицин	1,0 мг/мл
	Полоксамер 188	0,8 мг/мл
Pembro 37,5 мг/мл сост9	Пембролизумаб	37,5 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы д/г	80,0 мг/мл
	Глицин	1,5 мг/мл
	Полоксамер 188	1,0 мг/мл
Pembro 37,5 мг/мл сост10	Пембролизумаб	37,5 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы д/г	80,0 мг/мл
	Глицин	1,5 мг/мл
	Полоксамер 188	1,0 мг/мл
Pembro 50 мг/мл сост17	Пембролизумаб	50,0 мг/мл
	L-гистидин	0,432 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,464 мг/мл
	Трегалозы д/г	90,0 мг/мл
	Глицин	2,0 мг/мл

	Полоксамер 188	1,2 мг/мл
Pembro 25 мг/мл сост19	Пембролизумаб	25,0 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы д/г	80,0 мг/мл
	Глицин	1,5 мг/мл
	Полоксамер 188	1,0 мг/мл
Pembro 50 мг/мл сост20	Пембролизумаб	50,0 мг/мл
	L-гистидин	0,221 мг/мл
	L-гистидина гидрохлорид моногидрат	0,750 мг/мл
	Трегалозы д/г	80,0 мг/мл
	Глицин	1,5 мг/мл
	Полоксамер 188	1,0 мг/мл

Ускоренное хранение.

Фармацевтические композиции, содержащие белок в концентрации 25, 50 и 37,5 мг/мл приготовлены методом диафильтрации согласно методике 1 и заложены на ускоренное хранение при температуре 25 ± 2 °С в соответствии с методикой 8. Результаты исследования представлены в таблице 33 и на Фиг. 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

Таблица 33 – Результаты исследования стабильности

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	1 месяц	3 месяца	4 месяца	6 месяцев
6. Pembro 50 мг/мл сост6 pH5,1 70Tre+ 1Gly+0,8Koll	Концентрация, мг/мл	49,90	n/a	49,59	49,53	50,00
	pH	5,29	n/a	5,38	n/a	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	246	n/a	261	n/a	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,44	0,592	0,60	0,592	0,59

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	1 месяц	3 месяца	4 месяца	6 месяцев
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,53	99,36	99,36	99,36	99,33
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,16	17,28	21,17	22,69	26,63
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	69,51	66,89	63,35	63,87	59,40
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	14,32	15,83	15,48	13,44	13,97
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	5,24	12,32	13,06	20,93
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,47	97,76	97,47	97,58	96,95
	Содержание мономера, КЭФ перед. усл.	96,36	93,52	96,95	96,041	96,48
	Спец. активность	91	n/a	96	n/a	110
9. Rembro 37,5 мг/мл сост9	Концентрация, мг/мл	38,80	n/a	38,69	38,24	38,50
pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll	pH	5,63	n/a	5,74	n/a	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	285	n/a	287,00	n/a	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,45	0,59	0,61	0,59	0,60
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,53	99,34	99,34	99,34	99,32
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,50	17,24	22,21	22,77	28,21
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	69,74	67,36	63,91	63,11	59,62
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	13,76	15,40	13,88	14,12	12,17

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	1 месяц	3 месяца	4 месяца	6 месяцев
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	4,76	11,67	13,26	23,42
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,70	97,83	97,45	97,62	96,87
	Содержание мономера, КЭФ неред. усл.	96,25	93,40	96,86	97,41	96,42
	Спец. активность	100	n/a	92	n/a	114
10. Rembro 37,5 мг/мл сост10	Концентрация, мг/мл	38,00	n/a	35,37	38,05	38,00
pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll	pH	5,67	n/a	5,68	n/a	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	288	n/a	280,00	n/a	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,45	0,625	0,61	0,625	0,61
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,53	99,15	99,35	99,15	99,32
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,38	17,54	22,17	23,76	28,19
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	70,35	67,36	64,24	64,12	59,51
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	13,27	15,10	13,59	12,12	12,30
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	5,99	12,23	14,77	23,62
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,62	97,82	97,43	97,57	97,08

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	1 месяц	3 месяца	4 месяца	6 месяцев
	Содержание мономера, КЭФ перед. усл.	96,38	93,64	96,92	97,85	96,18
	Спец. активность	114	n/a	87	n/a	93
17. Pembro 50 мг/мл сост17	Концентрация, мг/мл	52,90	n/a	52,36	52,69	52,00
	pH	6,10	n/a	6,16	n/a	n/a
pH6,1 90Tre+ 2Gly+1,2Koll	Осмоляльность, мОсм/кг	336	n/a	337,00	n/a	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,58	0,76	0,86	0,76	0,90
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,34	99,18	99,10	99,18	99,03
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,54	18,22	24,92	27,67	32,81
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	70,27	65,97	62,69	61,04	57,28
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	13,19	15,81	12,39	11,30	9,91
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	8,61	16,76	22,25	32,55
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,66	97,79	97,20	97,47	96,78
	Содержание мономера, КЭФ перед. усл.	96,17	93,29	96,72	96,17	95,84
	Спец. активность	91	n/a	110	n/a	82
19. Pembro 25 мг/мл сост19	Концентрация, мг/мл	26,00	n/a	26,00	25,76	25,65
	pH	5,59	n/a	5,60	n/a	n/a
pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll IC	Осмоляльность, мОсм/кг	281	n/a	290,00	n/a	n/a

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	1 месяц	3 месяца	4 месяца	6 месяцев
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,43	0,53	0,53	0,53	0,50
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,55	99,41	99,44	99,41	99,42
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,08	17,30	22,15	23,85	28,08
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	70,71	67,01	64,15	64,31	59,79
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	13,21	15,69	13,70	11,85	12,13
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	7,40	13,13	15,53	24,00
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,67	97,62	97,36	97,31	96,98
	Содержание мономера, КЭФ перед. усл.	93,98	93,28	96,86	96,56	96,25
	Спец. активность	100	n/a	125	n/a	117
20. Rembro 50 мг/мл состав 20	Концентрация, мг/мл	51,70	n/a	52,59	51,8	52,20
pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll	pH	5,65	n/a	5,65	n/a	n/a
	Осмоляльность, мОсм/кг	287	n/a	304,00	n/a	n/a
	Содержание агрегатов (Э ВЭЖХ), %	0,50	0,692	0,69	0,692	0,71
	Содержание мономера (Э ВЭЖХ), %	99,48	99,25	99,26	99,25	99,22
	Кислые фракции (ИО ВЭЖХ), %	16,57	17,32	22,11	24,24	28,31

Информация об образцах	Показатель	Входной контроль	1 месяц	3 месяца	4 месяца	6 месяцев
	Основные фракции (ИО ВЭЖХ), %	70,47	67,58	64,30	63,90	59,97
	Щелочные фракции (ИО ВЭЖХ), %	12,97	15,10	13,59	11,86	11,72
	Абсолютное изменение профиля заряженных форм	n/a	5,77	12,33	15,35	23,49
	Содержание мономера, КЭФ ред. усл.	97,71	97,63	97,39	97,34	96,92
	Содержание мономера, КЭФ неред. усл.	94,18	92,83	96,78	96,03	96,19
	Спец. активность	97	n/a	109	n/a	99

Все фармацевтические композиции продемонстрировали приемлемый уровень изменений в ходе ускоренного хранения.

Фармацевтическая композиция, содержащая гистидиновый буферный раствор в диапазоне рН от 5,1 до 6,1, трегалозы дигидрата от 70 до 90 мг/мл, L-глицина от 1,0 до 2,0 мг/мл и полоксамера 188 от 0,8 до 1,2 мг/мл, продемонстрировала приемлемый уровень агрегатообразования (прирост агрегатов за 6 месяцев при 25 ± 2 °С составил не более 0,32%), а также низкое изменение кислотно-щелочного профиля (изменение содержания основной фракции не более 13,0 %) и незначительное изменение специфической активности при ускоренном хранении как при концентрации моноклонального антитела Пембролизумаба 25 мг/мл, так и при повышенной концентрации до 50 мг/мл.

Добавление трегалозы дигидрата способствовало увеличению температуры агрегации и температуры плавления пембролизумаба. Также наблюдалось наименьшее изменение показателей качества при термическом

воздействии, отмечены незначительные изменения показателей качества после шейкирования и заморозки. Глицин также положительно влияет на температуры агрегации и плавления, а также на диффузионный параметр взаимодействия. Отмечено положительное влияние глицина на показатели качества белка при кислотном и щелочном гидролизах. Добавление в состав полксамера 188 способствует стабилизации исследуемого белка при шейкировании и заморозке.

По результатам стресс-стабильности разработанный состав вспомогательных веществ Пембролизумаба показал значимые преимущества по сравнению с составом Китруды при термическом воздействии, при кислотном и щелочном гидролизах, а также при фотовоздействии наблюдали значительно меньшую склонность к окислению, которое значимо влияет на структуру и специфическую активность белка и увеличение склонности к агрегации.

Были проведены примеры исследований с использованием водных фармацевтических композиций пембролизумаба. Водная фармацевтическая композиция, используемая для дальнейших исследований, охарактеризована в таблице 34.

Таблица 34 – Водная фармацевтическая композиция пембролизумаба.

Компонент	В 1,0 мл	Во флаконе
Пембролизумаб	25 мг	100 мг
L-гистидин	0,221 мг	0,884 мг
L-гистидина гидрохлорида моногидрат	0,750 мг	3,0 мг
Трегалозы дигидрат	80 мг	320 мг
Глицин	1,5 мг	6,0 мг
Полоксамер 188	1,0 мг	4,0 мг
Вода для инъекций	до 1 мл	до 4 мл

В результате проведенных экспериментов было установлено, что состав препарата Китруда (Keytruda) имеет ряд недостатков: 1) недостаточная коллоидная стабильность антитела, 2) недостаточная стабильность при термическом воздействии, 3) низкая стабильность профиля заряженных форм при механическом воздействии и замораживании.

В рамках данного изобретения были получены фармацевтические композиции, которые обладают достаточной коллоидной и термической стабильностью, а также высокой стабильностью профиля заряженных форм при механическом воздействии и замораживании. Кроме того, фармацевтические композиции, содержащие в своем составе трегалозу и полоксамер 188 (например, состав, указанный в таблице 34), дополнительно характеризуются низкой склонностью к образованию высокомолекулярных примесей при длительном хранении, а также низкой склонностью к окислению, потере специфической активности и приросту примесей при фотовоздействии и длительном хранении.

Полученные данные о стабильности фармацевтических композиций свидетельствуют о совместимости вспомогательных веществ друг с другом и с действующим веществом.

Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция пембролизумаба, содержащая:
 - (i) пембролизумаб;
 - (ii) гистидин;
 - (iii) гистидина гидрохлорида моногидрат;
 - (iv) глицин;
 - (v) трегалозу и полоксамер 188, или пролин; и
 - (vi) воду для инъекций.
2. Фармацевтическая композиция по п. 1, где пембролизумаб находится в концентрации 5-50 мг/мл.
3. Фармацевтическая композиция по п. 1, где гистидин находится в концентрации 0,087-0,432 мг/мл.
4. Фармацевтическая композиция по п. 1, где гистидина гидрохлорида моногидрат находится в концентрации 0,464-0,931 мг/мл.
5. Фармацевтическая композиция по п. 1, где глицин находится в концентрации 1-2 мг/мл.
6. Фармацевтическая композиция по п. 1, где трегалоза находится в концентрации 70-130 мг/мл.
7. Фармацевтическая композиция по п. 1, где полоксамер 188 находится в концентрации 0,8-1,2 мг/мл.
8. Фармацевтическая композиция по п. 1, где пролин находится в концентрации 20-34 мг/мл.
9. Фармацевтическая композиция по п. 1, содержащая:
 - (i) 5-50 мг/мл пембролизумаба;
 - (ii) 0,087-0,432 мг/мл гистидина;
 - (iii) 0,464-0,931 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1-2 мг/мл глицина;
 - (v) 70-130 мг/мл трегалозы и 0,8-1,2 мг/мл полоксамера 188, или

- 20-34 мг/мл пролина; и
- (vi) воду для инъекций до 1 мл.
10. Фармацевтическая композиция по п. 9, где пембролизумаб находится в концентрации 20-30 мг/мл.
11. Фармацевтическая композиция по п. 10, где пембролизумаб находится в концентрации 25 мг/мл.
12. Фармацевтическая композиция по п. 9, где гистидин находится в концентрации 0,200-0,319 мг/мл.
13. Фармацевтическая композиция по п. 12, где гистидин находится в концентрации 0,221 мг/мл.
14. Фармацевтическая композиция по п. 9, где гистидина гидрохлорида моногидрат находится в концентрации 0,650-0,850 мг/мл.
15. Фармацевтическая композиция по п. 14, где гистидина гидрохлорида моногидрат находится в концентрации 0,750 мг/мл.
16. Фармацевтическая композиция по п. 9, где глицин находится в концентрации 1,5 мг/мл.
17. Фармацевтическая композиция по п. 9, где трегалоза находится в концентрации 70-100 мг/мл.
18. Фармацевтическая композиция по п. 17, где трегалоза находится в концентрации 75-85 мг/мл.
19. Фармацевтическая композиция по п. 18, где трегалоза находится в концентрации 80 мг/мл.
20. Фармацевтическая композиция по п. 1, где трегалоза является трегалозы дигидратом.
21. Фармацевтическая композиция по п. 9, где полоксамер 188 находится в концентрации 1,0 мг/мл.
22. Фармацевтическая композиция по п. 9, где пролин находится в концентрации 24-30 мг/мл.
23. Фармацевтическая композиция по п. 22, где пролин находится в концентрации 27 мг/мл.

24. Фармацевтическая композиция по п. 1, где композиция имеет рН 5,1-6,1.
25. Фармацевтическая композиция по п. 24, где композиция имеет рН 5,6.
26. Фармацевтическая композиция по п. 1, содержащая:
- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
 - (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
 - (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1,5 мг/мл глицина;
 - (v) 80 мг/мл трегалозы и 1,0 мг/мл полоксамера 188;
 - (vi) воду для инъекций до 1 мл; и
- где композиция имеет рН 5,5 – 5,7.
27. Фармацевтическая композиция по п. 20, содержащая:
- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
 - (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
 - (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1,5 мг/мл глицина;
 - (v) 80 мг/мл трегалозы дигидрата и 1,0 мг/мл полоксамера 188;
 - (vi) воду для инъекций до 1 мл; и
- где композиция имеет рН 5,5 – 5,7.
28. Фармацевтическая композиция по п. 1, содержащая:
- (i) 25 мг/мл пембролизумаба;
 - (ii) 0,221 мг/мл гистидина;
 - (iii) 0,750 мг/мл гистидина гидрохлорида моногидрата;
 - (iv) 1,5 мг/мл глицина;
 - (v) 27 мг/мл пролина;
 - (vi) воду для инъекций до 1 мл; и
- где композиция имеет рН 5,5 – 5,7.
29. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 26-28, где композиция имеет рН 5,6.

30. Фармацевтическая композиция пембролизумаба, полученная лиофилизацией фармацевтической композиции пембролизумаба по любому из пп. 1-29.

31. Применение фармацевтической композиции пембролизумаба по любому из пп. 1-30 для лечения злокачественного новообразования или инфекционного заболевания.

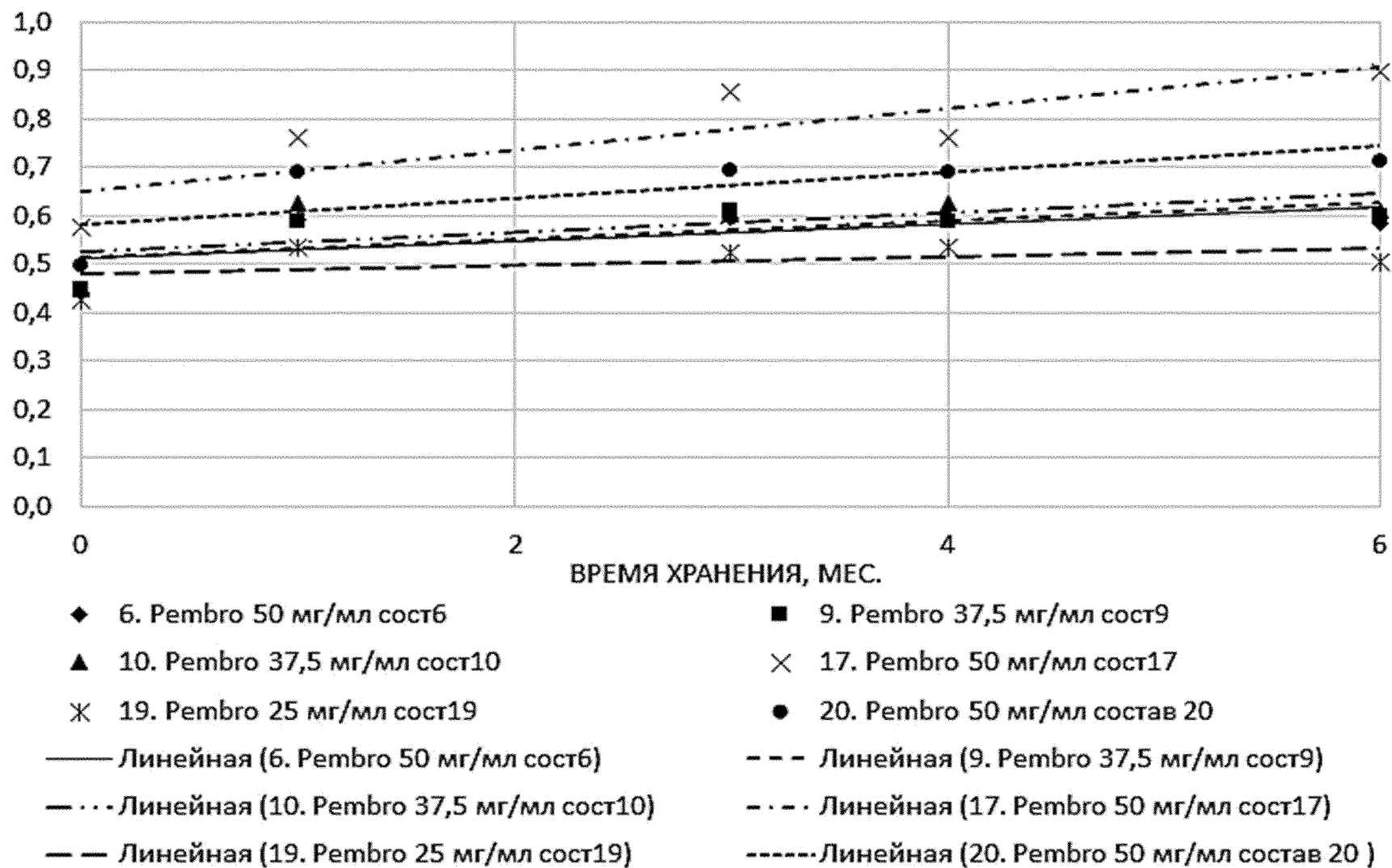
32. Применение по п. 31, где злокачественное новообразование выбрано из группы: меланома, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи, первичная медиастинальная В-клеточная крупноклеточная лимфома, уротелиальный рак, рак желудка, злокачественное новообразование с высоким уровнем микросателлитной нестабильности или с дефицитом белков системы репарации ДНК (MMR), гепатоцеллюлярный рак, рак шейки матки, карцинома Меркеля, почечно-клеточный рак, рак эндометрия, рак пищевода, плоскоклеточный рак кожи, базально-клеточный рак, рак молочной железы, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак желчного пузыря, злокачественная опухоль головного мозга, глиобластома, опухоль с высокой мутационной нагрузкой.

33. Применение фармацевтической композиции пембролизумаба по любому из пп. 1-30 для получения лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования или инфекционного заболевания.

34. Применение по п. 33, где злокачественное новообразование выбрано из группы: меланома, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи, первичная медиастинальная В-клеточная крупноклеточная лимфома, уротелиальный рак, рак желудка, злокачественное новообразование с высоким уровнем микросателлитной нестабильности или с дефицитом белков системы репарации ДНК (MMR), гепатоцеллюлярный рак, рак шейки матки, карцинома Меркеля, почечно-клеточный рак, рак эндометрия, рак пищевода, плоскоклеточный рак кожи,

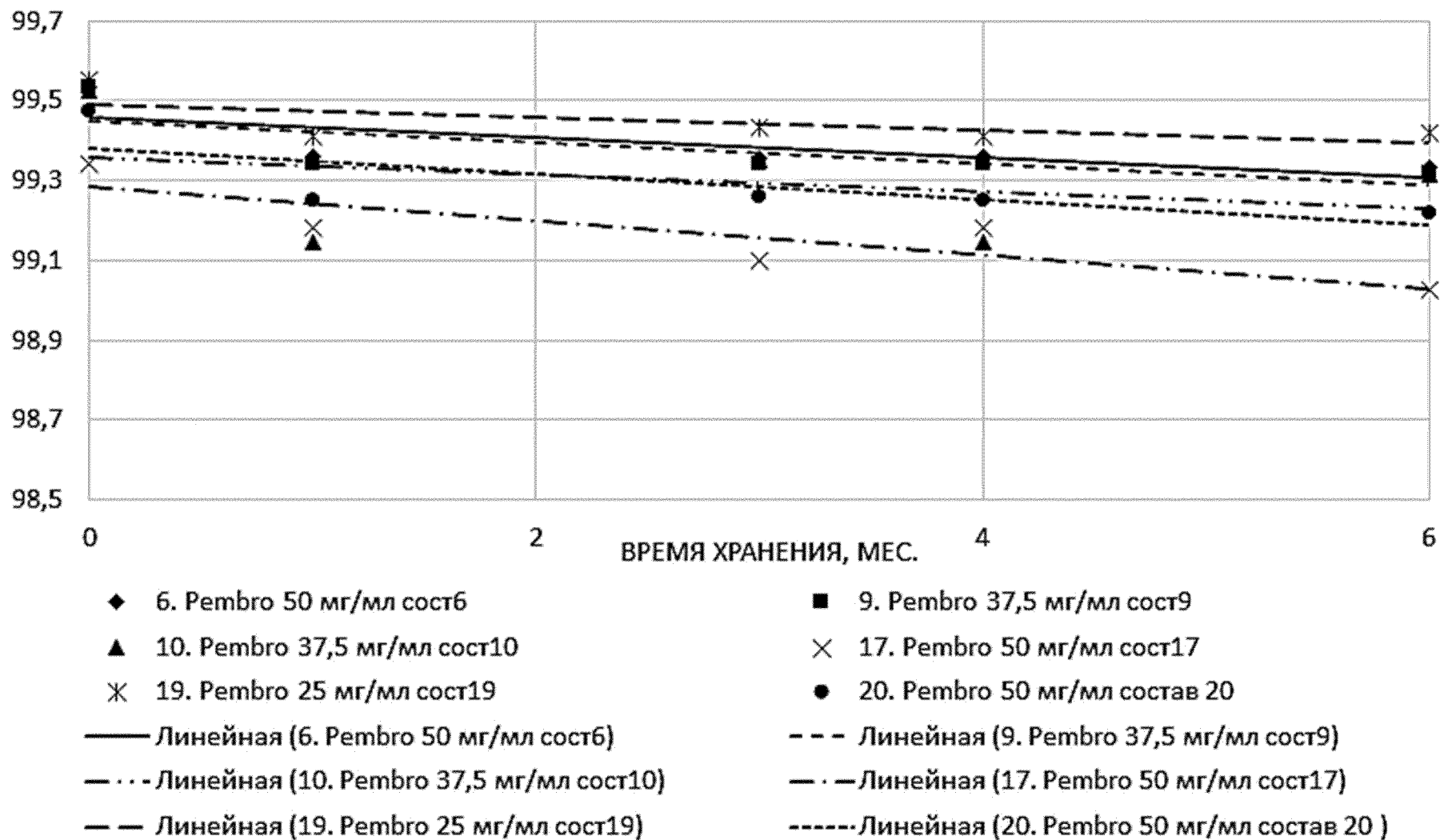
базально-клеточный рак, рак молочной железы, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак желчного пузыря, злокачественная опухоль головного мозга, глиобластома, опухоль с высокой мутационной нагрузкой.

СОДЕРЖАНИЕ АГРЕГАТОВ, Э ВЭЖХ, %



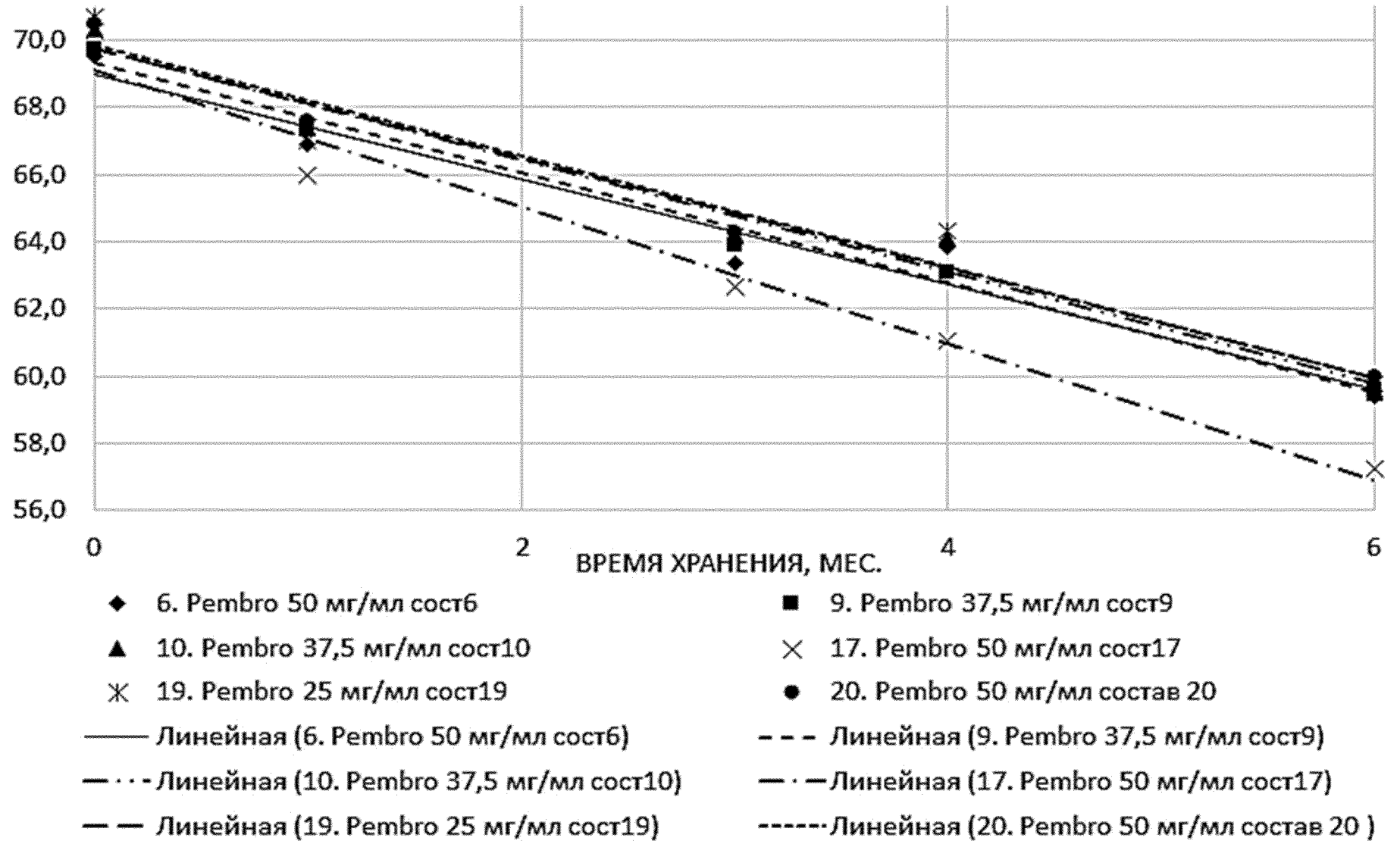
Фиг. 1

СОДЕРЖАНИЕ МОНОМЕРА, Э ВЭЖХ, %

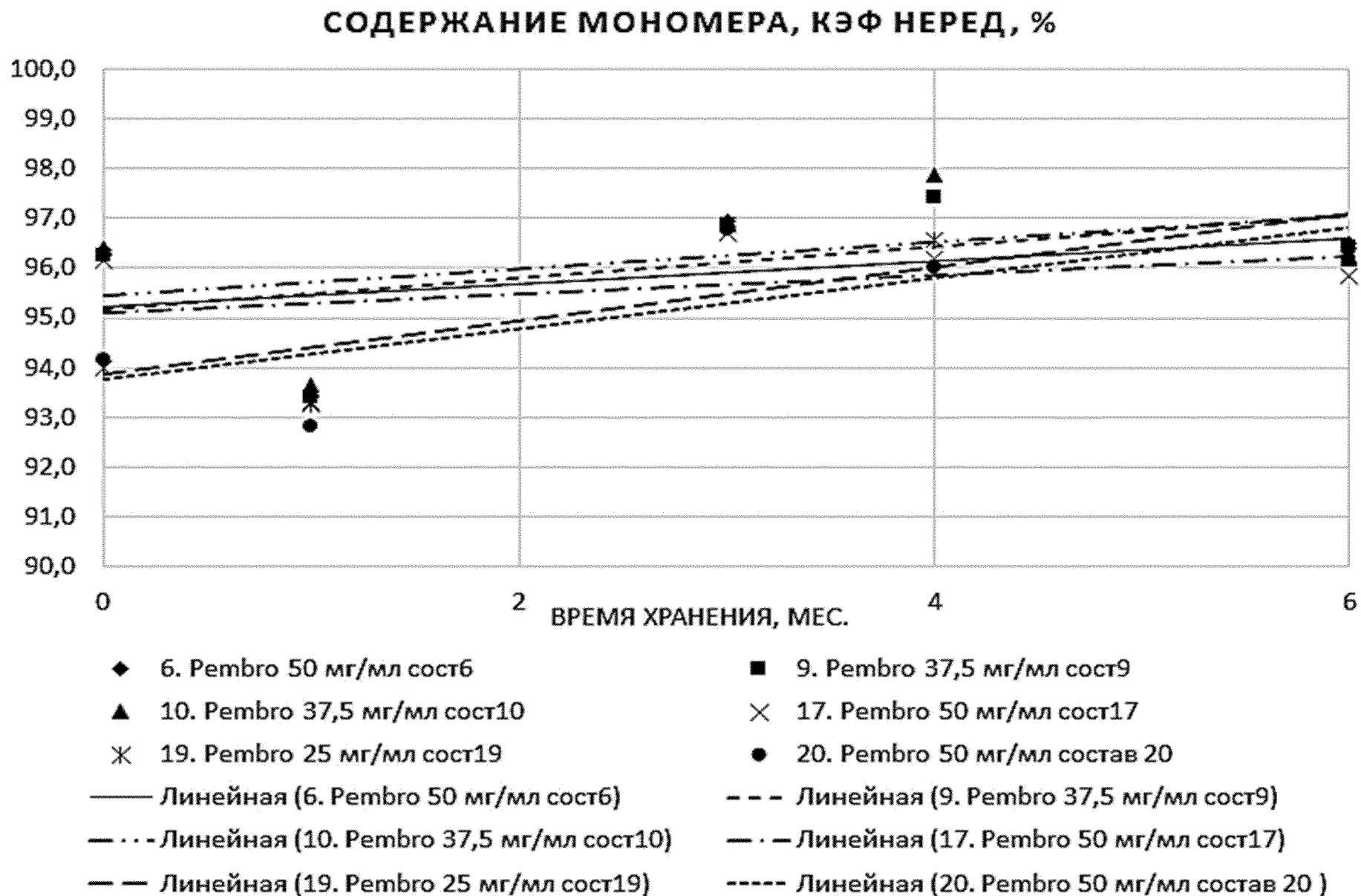


Фиг. 2

СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНОЙ ФРАКЦИИ, ИО ВЭЖХ %

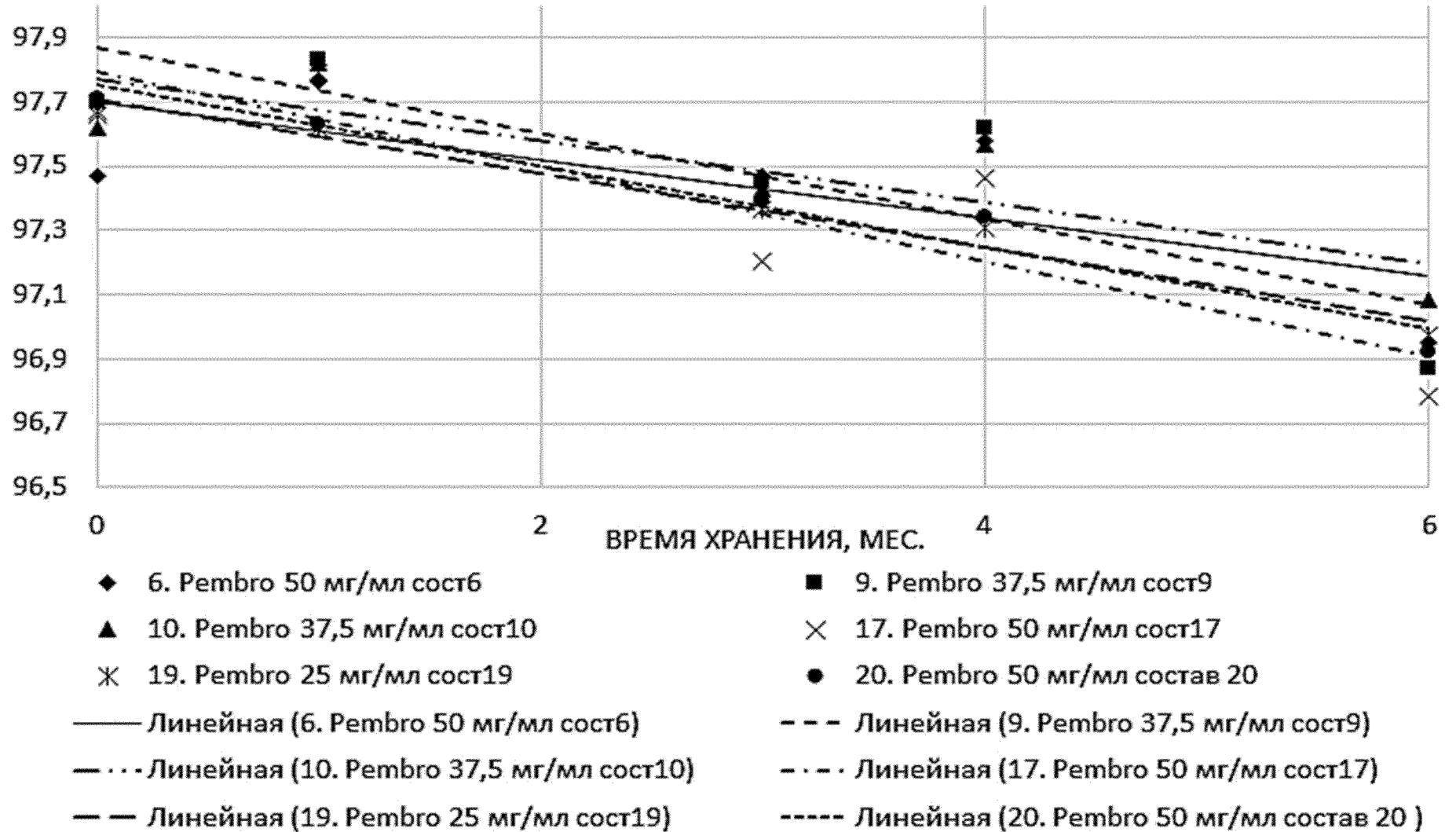


Фиг.3



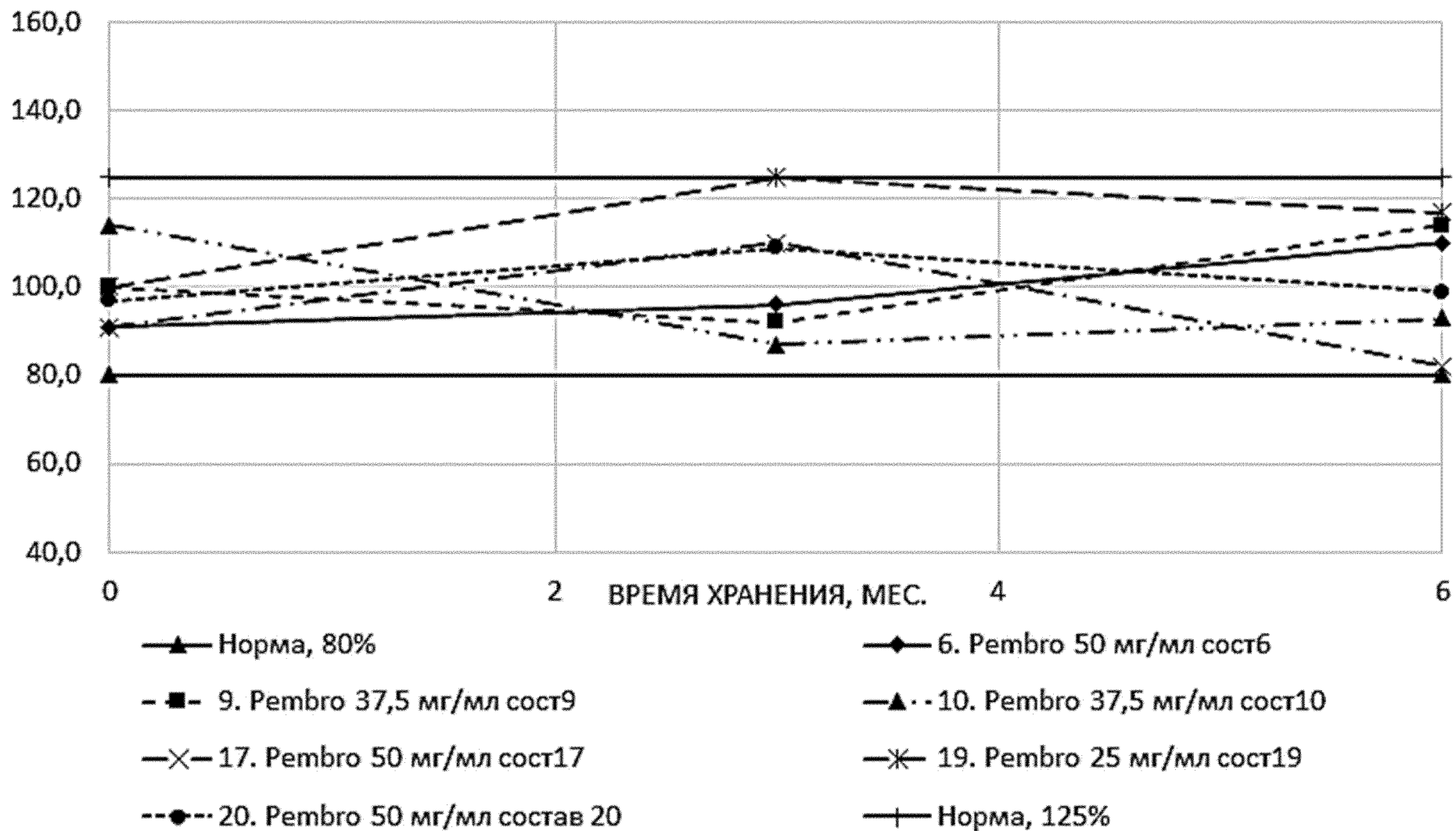
Фиг. 4

СОДЕРЖАНИЕ СУММЫ ЛЕГКОЙ И ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ, КЭФ РЕД, %



Фиг. 5

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ СПЕЦ. АКТИВНОСТЬ, %



Фиг. 6