COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE PEMBROLIZUMAB Y SU USO

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el campo de la farmacia y la medicina, específicamente con las composiciones farmacéuticas del anticuerpo anti-PD-1 pembrolizumab, que pueden utilizarse para el tratamiento de neoplasias malignas o enfermedades infecciosas.

Antecedentes de la invención

La proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28 y se localiza en la superficie celular de linfocitos T, células B, monocitos, células NK y células dendríticas (Jin H.T., Ahmed R., Okazaki T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. Curr Top Microbiol Immunol. 2011; 350: 17-37). El PD-1 es un receptor transmembrana de la familia de las inmunoglobulinas y consta de 288 aminoácidos. La estructura de la proteína incluye un dominio IgV extracelular, un brazo espaciador, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. Este último incluye 2 secuencias que contienen tirosina (ITIM e ITSM) que participan en la señalización en una célula (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 tiene 2 ligandos inhibidores, PD-L1 y PD-L2, que también son receptores transmembrana y desempeñan un papel importante en la homeostasis inmunitaria. PD-L1 se expresa en células T y B, células dendríticas, macrófagos, células endoteliales, hematopoyéticas y epiteliales. Además, se ha detectado la expresión de PD-L1 en las células de muchos tipos de tumores malignos, como el melanoma, el carcinoma de células renales, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, los tumores de cabeza y cuello, los tumores del tracto gastrointestinal, el cáncer de ovario, los linfomas y las leucemias (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 tiene una expresión limitada en macrófagos y células dendríticas activadas y se une principalmente al receptor PD-1. El principal factor que aumenta la expresión de PD-L1 y PD-L2 es la citocina antiinflamatoria IFNy.

El receptor PD-1 y su ligando PD-L1 desempeñan un papel importante en la supervivencia y la progresión de las neoplasias malignas. Como se ha señalado anteriormente, la expresión del receptor PD-L1 aumenta en la superficie de muchos tipos de células malignas. La interacción PD-L1/PD-1 estimula el desarrollo de la inmunosupresión en el microambiente tumoral y, por tanto, protege a las células tumorales de la actividad de las células T citotóxicas CD8+. El sistema PD-1/PD-L1 es un objetivo terapéutico prometedor (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).

Se conoce el anticuerpo anti-PD-1 pembrolizumab, que es un anticuerpo monoclonal G4 (IgG4) humanizado contra el receptor PD-1 humano (PCT/US2008/007463). Se produjo mediante la combinación de secuencias variables de un anticuerpo murino de alta afinidad contra el receptor PD-1 y un marco IgG4 kappa humano que contiene una mutación estabilizadora S228P en el fragmento Fc. Bloquea selectivamente la unión del receptor PD-1 a sus ligandos, reactivando la inmunidad antitumoral. La activación de la respuesta inmunitaria estimula la eliminación de las células tumorales.

Pembrolizumab ha demostrado una alta eficacia en el tratamiento de varios tipos de tumores malignos: melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin clásico, carcinoma urotelial, cáncer de estómago, neoplasias malignas con alta inestabilidad de microsatélites, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, cáncer de cuello de útero, carcinoma de células de Merkel, cáncer de células renales, cáncer de endometrio, etc. También se sabe que el pembrolizumab se utiliza para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Actualmente, se está estudiando el pembrolizumab en la terapia de otras enfermedades o trastornos en los que la inhibición de la actividad de PD-1 puede ser deseable.

El estado de la técnica proporciona Keytruda, un producto terapéutico que incluye pembrolizumab, sacarosa, polisorbato 80 y un tampón de histidina (PCT/US2012/031063). A pesar de ello, todavía se necesitan nuevas composiciones farmacéuticas estables mejoradas de pembrolizumab.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico del contenido de agregados determinado por SE HPLC (%) frente al tiempo de almacenamiento a una temperatura de 25 ± 2 °C para el anticuerpo monoclonal pembrolizumab en las formulaciones de prueba.

La figura 2 es un gráfico del contenido de monómero determinado por SE HPLC (%) frente al tiempo de almacenamiento a una temperatura de 25 ± 2 °C para el anticuerpo monoclonal pembrolizumab en las formulaciones de prueba.

La figura 3 es un gráfico del contenido de la fracción básica determinado por IE HPLC (%) frente al tiempo de almacenamiento a una temperatura de 25 ± 2 °C para el anticuerpo monoclonal pembrolizumab en las formulaciones de prueba.

La figura 4 es un gráfico del contenido de monómero determinado por EC en condiciones no reductoras (%) frente al tiempo de almacenamiento a una temperatura de 25 ± 2 °C para el anticuerpo monoclonal pembrolizumab en las formulaciones de prueba.

La figura 5 es un gráfico del contenido de la suma de cadenas pesadas y ligeras determinado por EC en condiciones reductoras (%) frente al tiempo de almacenamiento a una temperatura de 25 ± 2 °C para el anticuerpo monoclonal pembrolizumab en las formulaciones de prueba.

La figura 6 es un gráfico de la actividad específica relativa (%) frente al tiempo de almacenamiento a una temperatura de 25 ± 2 °C para el anticuerpo monoclonal pembrolizumab en las formulaciones de prueba.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

A menos que se definan de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en relación con la presente invención tendrán el mismo significado que suelen entender los expertos en la técnica.

Además, salvo que el contexto exija lo contrario, los términos en singular incluirán los términos en plural, y los términos en plural incluirán los términos en singular.

Tal como se utiliza en la presente descripción y en las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto dicte lo contrario, las palabras "tener", "incluir" y "comprender" o sus variaciones, como "tiene", "incluye", o "comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una composición y/o formulación que comprende pembrolizumab en una cantidad terapéuticamente eficaz y excipientes o sustancias auxiliares (portadores, diluyentes, cargas, disolventes, etc.), cuya elección y proporciones dependen del tipo y la vía de administración y dosificación.

El término "composición acuosa", tal como se utiliza aquí, se refiere a una composición a base de agua, el agua en la composición puede ser: agua, agua para inyecciones, solución salina fisiológica (solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9%-1,0%).

El término "liofilizado" utilizado aquí se refiere a una formulación que ha sido sometida a un proceso conocido en la técnica como liofilización, que incluye la congelación de la formulación seguida de la eliminación del hielo del contenido congelado.

La composición farmacéutica es "estable" si el agente activo conserva la estabilidad física y/o la estabilidad química y/o la actividad biológica del mismo durante la vida útil especificada a una temperatura de almacenamiento, por ejemplo, de entre 2 y 8 °C. Además, el agente activo puede conservar tanto la estabilidad física como la química, así como la actividad biológica. El periodo de almacenamiento se ajusta en función de los resultados de la prueba de estabilidad en condiciones de envejecimiento acelerado o natural.

El término "almacenamiento a largo plazo" o "estabilidad a largo plazo" se entiende como que una composición farmacéutica puede almacenarse durante tres meses o más, durante seis meses o más, durante un año o más, y la composición puede tener una vida útil estable mínima de al menos dos años también. En general, los términos "almacenamiento a largo plazo" y "estabilidad a largo plazo" incluyen, además, duraciones de almacenamiento estables que son al menos comparables o mejores que la vida útil estable requerida típicamente para las formulaciones comerciales actualmente disponibles del anticuerpo anti-PD-1 pembrolizumab, sin pérdidas de estabilidad que harían que la formulación fuera inadecuada para su aplicación farmacéutica prevista.

El término "agente tampón" se refiere a un componente ácido o básico (típicamente un ácido débil o una base débil) del tampón o solución tampón. Un agente tampón ayuda a mantener el valor del pH de una solución dada en un valor predeterminado o cerca de él, y los agentes tampón se eligen generalmente para complementar el valor predeterminado. Un agente tampón puede ser un compuesto único que da lugar a un efecto tampón deseado, especialmente cuando dicho agente tampón se mezcla con (y es convenientemente capaz de intercambiar protones con) una cantidad adecuada (dependiendo del valor predeterminado deseado) del correspondiente "conjugado ácido/base" del mismo.

El término "tampón" o "solución tampón" se refiere a una solución acuosa que comprende una mezcla de un ácido (típicamente un ácido débil, como por ejemplo ácido acético, ácido cítrico) y una base conjugada del mismo (como por ejemplo una sal de acetato o citrato, por ejemplo acetato de sodio, citrato de sodio, así como hidratos de dichas sales, por ejemplo, acetato de sodio trihidratado) o alternativamente una mezcla de una base (típicamente una base débil, p. ej. histidina) y un ácido conjugado de la misma (p. ej. clorhidrato de histidina o clorhidrato de histidina monohidratado o clorhidrato de L-histidina (h/c) monohidratado (m/h) o L-histidina h/c m/h o histidina h/c m/h). El valor del pH de una "solución tampón" sólo cambia ligeramente al añadirle una pequeña cantidad de base fuerte o de ácido fuerte, así como al diluirla o concentrarla, debido al "efecto tampón" impartido por un "agente tampón".

En la presente solicitud, un "sistema tampón" comprende uno o más agentes tampón y/o un conjugado ácido/base de los mismos, y más convenientemente comprende uno o más agentes tampón y un conjugado ácido/base de los mismos, y más convenientemente comprende un agente tampón y un conjugado ácido/base de los mismos. A menos que se especifique lo contrario, cualquier concentración referida aquí a un "sistema tampón" (una concentración tampón) puede referirse adecuadamente a la concentración combinada de agente(s) tampón y/o conjugado(s) ácido/base de los mismos. En otras palabras, las concentraciones referidas aquí a un "sistema tampón" pueden referirse a la concentración combinada de todas las especies tampón relevantes

(es decir, las especies en equilibrio dinámico entre sí, por ejemplo, citrato/ácido cítrico). El pH global de la composición que comprende el sistema tampón pertinente es un reflejo de la concentración de equilibrio de cada una de las especies tampón pertinentes (es decir, el equilibrio entre el agente o agentes tampón y los conjugados ácido/base de los mismos).

Las soluciones tampón pueden ser, por ejemplo, acetato, fosfato, citrato, histidina, succinato y otras soluciones tampón. Generalmente, la composición farmacéutica tiene preferentemente un pH en el rango de 4,0 a 8,0.

"Estabilizador" se refiere a un excipiente o una mezcla de dos o más excipientes que proporcionan la estabilidad física y/o química del agente activo. Los estabilizadores pueden ser aminoácidos, por ejemplo, y sin carácter exhaustivo, arginina, histidina, glicina, lisina, glutamina, prolina; tensioactivos, por ejemplo, y sin carácter exhaustivo, polisorbato 20 (nombre comercial: Tween 20), polisorbato 80 (nombre comercial: Tween 80), polietileno-polipropilenglicol y copolímeros de los mismos (nombres comerciales: Poloxamer, Pluronic, dodecilsulfato de sodio (SDS); antioxidantes, por ejemplo, y sin carácter exhaustivo, metionina, acetilcisteína, ácido ascórbico, monotioglicerol, sales de ácido sulfuroso, etc.; agentes quelantes, por ejemplo, y sin carácter exhaustivo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), citrato de sodio, etc.

Los términos "agente osmótico" o "agente regulador de la tonicidad", así como "osmolito", tal y como se utilizan en el presente documento, se refieren a un excipiente que puede proporcionar la presión osmótica necesaria de una solución líquida de anticuerpos. En algunas realizaciones, el agente regulador de la tonicidad puede aumentar la presión osmótica de una formulación líquida de anticuerpos hasta una presión isotónica, de manera que dicha formulación líquida de anticuerpos sea fisiológicamente compatible con las células del tejido del organismo de un sujeto. En otra realización, el agente regulador de la tonicidad puede contribuir a aumentar la estabilidad de los anticuerpos. La formulación "isotónica" es una formulación que tiene una presión osmótica equivalente a la de la sangre humana. Las formulaciones isotónicas suelen tener una presión osmótica de aproximadamente 239 a 376 mOsm/kg. Un agente tonificante puede estar en forma enantiomérica (por ejemplo, enantiómero L o D) o racémica; en forma de isómeros, como alfa o beta, incluyendo alfa, alfa; o beta, beta; o beta, alfa; en forma de ácido libre o base libre; en forma de sal; en forma hidratada (por ejemplo, monohidrato o dihidrato), o en forma anhidra. Los agentes osmóticos ejemplares son, entre otros, azúcares (trehalosa, trehalosa dihidratada, sacarosa, glucosa), polioles (manitol, sorbitol), aminoácidos (prolina o L-prolina, arginina, glicina) o sales (cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio).

Tal como se utiliza aquí, el término "solubilizador" se refiere a un tensioactivo no iónico farmacéuticamente aceptable. Pueden utilizarse tanto un solubilizador como combinaciones de

solubilizadores. Algunos ejemplos de solubilizadores son, sin limitación, el polisorbato 20 o el polisorbato 80, el poloxámero 184 o el poloxámero 188, o PLURONIC®.

Normalmente, los aminoácidos son L-aminoácidos. Por ejemplo, si se utiliza histidina y clorhidrato de histidina monohidratado, suele ser L-histidina y clorhidrato de L-histidina monohidratado. Por ejemplo, si se utiliza prolina, suele ser L-prolina. También pueden utilizarse equivalentes de aminoácidos, por ejemplo, sales de prolina farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, clorhidrato de prolina).

El término "medicamento" o "formulación" es una sustancia (o una mezcla de sustancias como composición farmacéutica) en forma de comprimidos, cápsulas, soluciones, ungüentos y otras formas preparadas destinadas al restablecimiento, la mejora o la modificación de las funciones fisiológicas en los seres humanos y los animales, y al tratamiento y la profilaxis de enfermedades, para el diagnóstico, la anestesia, la anticoncepción, la cosmetología y otros.

El término "uso" se aplica a la posibilidad de utilizar la composición farmacéutica de pembrolizumab según la presente invención para tratar, aliviar el curso de las enfermedades, acelerar la remisión, reducir la tasa de recurrencia de enfermedades o trastornos.

El término "método de tratamiento" se aplica a la posibilidad de utilizar la composición farmacéutica de pembrolizumab según la presente invención para tratar, aliviar el curso de las enfermedades, acelerar la remisión, reducir la tasa de recurrencia de las enfermedades o trastornos. "Tratar" o "tratamiento", "profilaxis" de una enfermedad, trastorno o afección puede comprender la prevención o el retraso de la aparición de los síntomas clínicos de una enfermedad, trastorno o afección que se desarrolla en el ser humano, la inhibición de una enfermedad, trastorno o afección, es decir detener, reducir o retrasar el desarrollo de una enfermedad o una recaída de la misma (en caso de terapia de mantenimiento) o al menos un síntoma clínico o subclínico de la misma, o el alivio o la flexibilización de una enfermedad, es decir, provocar la regresión de una enfermedad, trastorno o afección.

El término "administración parenteral" se refiere a los regímenes de administración, típicamente realizados por inyección (infusión), e incluye, en particular, la inyección o infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratraqueal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Abreviaturas

CE - control de entrada,

CD - congelación-descongelación,

k_D - parámetro de interacción de difusión,

Rh - radio hidrodinámico,

SH - sacudida,

T - temperatura,

T ons - temperatura de inicio de la fusión,

T1 - primera temperatura de fusión,

T2 - segunda temperatura de fusión,

T agr - temperatura de agregación,

TS - estrés térmico,

TS50 96H - parámetro de calidad tras un estrés térmico a 50°C durante 96 horas,

Δ TS50 96H - cambio en el parámetro de calidad tras el estrés (estrés térmico a 50°C durante 96 horas),

TS50 - parámetro de calidad tras un estrés térmico a 50°C durante 10 días,

Δ TS50 - cambio en el parámetro de calidad tras el estrés (estrés térmico a 50°C durante 10 días),

Δ abs - cambio absoluto en el perfil de la variante cargada determinado por el método 21,

SH800 96H - parámetro de calidad después de la agitación (shake) durante 96 horas,

Δ SH800 96H - cambio en el parámetro de calidad tras el estrés (agitación durante 96 horas),

SH800 - parámetro de calidad después de la agitación (shake) durante 14 días,

Δ SH800 - cambio en el parámetro de calidad tras el estrés (agitación durante 14 días),

CD(-20)*5 - parámetro de calidad tras 5 ciclos de congelación,

CD(-20)*3 - parámetro de calidad tras 3 ciclos de congelación,

Δ CD(-20)*5 - cambio en el parámetro de calidad tras el estrés (5 ciclos de congelación),

Δ CD(-20)*3 - cambio en el parámetro de calidad tras el estrés(3 ciclos de congelación),

Ácido 3,5 1H - parámetro de calidad tras la hidrólisis ácida a pH 3,5 y el envejecimiento durante 1 hora,

Ácido 4,0 - parámetro de calidad tras la hidrólisis ácida a pH 4,0 y el envejecimiento durante 10 días,

Δ Ácido 3,5 1H - cambio en el parámetro de calidad tras el estrés (hidrólisis ácida a pH 3,5 y envejecimiento durante 1 hora),

Δ Ácido 4,0 - cambio en el parámetro de calidad tras el estrés (hidrólisis ácida a pH 4,0 y envejecimiento durante 10 días),

Básico 8,5 1H - parámetro de calidad tras la hidrólisis básica a pH 8,5 y el envejecimiento durante 1 hora,

Básico 8,0 - parámetro de calidad tras la hidrólisis básica hasta el pH 8,0 y el envejecimiento durante 10 días,

Δ Básico 8,5 1H - cambio en el parámetro de calidad tras el estrés (hidrólisis básica a pH 8,5 y envejecimiento durante 1 hora),

Δ Básico 8,0 - cambio en el parámetro de calidad tras el estrés (hidrólisis básica a pH 8,0 y envejecimiento durante 10 días),

Ox 0,1% - parámetro de calidad tras la oxidación con peróxido de hidrógeno durante 4 horas,

Δ Ox 0,1% - cambio en el parámetro de calidad tras el estrés (oxidación con peróxido de hidrógeno durante 4 horas),

UV - parámetro de calidad tras el fotoestrés, dosis ICH×1,

Δ UV - cambio en el parámetro de calidad tras el estrés (fotoestrés, dosis ICH×1),

n/d - no determinado,

UV - Exposición a los rayos UV,

IE HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento con intercambio iónico,

EC - electroforesis capilar,

No red. - Condiciones no reductoras,

SW - software,

Red. - condiciones de reducción

SA - actividad específica (potencia),

SE HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento por exclusión de tamaño.

La presente invención da a conocer composiciones farmacéuticas del anticuerpo anti-PD-1 pembrolizumab, que pueden utilizarse como medicamento para tratar neoplasias malignas o enfermedades infecciosas.

Durante la selección de la formulación, tuvimos en cuenta la finalidad, la vía de administración y la tolerabilidad del medicamento (por ejemplo, la reducción de las molestias durante la administración), así como la estabilidad y la conservación de la actividad de la molécula proteica dentro de la formulación.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

(i) pembrolizumab;

(ii) histidina

(iii) clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) glicina;

(v) trehalosa y poloxamer 188, o

prolina; y

(vi) agua para inyección.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) pembrolizumab;

(ii) histidina

(iii) clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) glicina;

(v) trehalosa y poloxamer 188; y

(vi) agua para inyección.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) pembrolizumab;

(ii) histidina

(iii) clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) glicina;

(v) prolina; y

(vi) agua para inyección.

La concentración de pembrolizumab contenida en las composiciones farmacéuticas de la presente invención puede variar en función de las propiedades deseadas de las composiciones, así como de las condiciones, métodos y fines particulares de uso de las composiciones farmacéuticas.

En algunas realizaciones de la invención, el pembrolizumab está presente en una concentración de 5-50 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,087-0,432 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,464-0,931 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 1-2 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa está presente en una concentración de 70-130 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el poloxamer 188 está presente en una concentración de 0,8-1,2 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la prolina está presente en una concentración de 20-34 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) 5-50 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,087-0,432 mg/ml de histidina;

(iii) 0,464-0,931 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1-2 mg/ml de glicina;

(v) 70-130 mg/ml de trehalosa y 0,8-1,2 mg/ml de poloxamer 188, o

20-34 mg/ml de prolina; y

(vi) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) 5-50 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,087-0,432 mg/ml de histidina;

(iii) 0,464-0,931 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1-2 mg/ml de glicina;

(v) 70-130 mg/ml de trehalosa y 0,8-1,2 mg/ml de poloxamer 188; y

(vi) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) 5-50 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,087-0,432 mg/ml de histidina;

(iii) 0,464-0,931 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1-2 mg/ml de glicina;

(v) 20-34 mg/ml de prolina; y

(vi) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, el pembrolizumab está presente en una concentración de 15-35 mg/ml, o 20-30 mg/ml, o 25 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,200-0,319 mg/ml, o 0,200-0,250 mg/ml, o 0,210-0,240 mg/ml, o 0,210-230 mg/ml, o 0,215-0,230 mg/ml, o 0,215-0,225 mg/ml, o 0,220-0,225 mg/ml, o 0,221 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina es L-histidina.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,600-0,900 mg/ml o 0,650-0,850 mg/ml, o 0,700-0,800 mg/ml, o 0,730-0,770 mg/ml, o 0,750 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado es clorhidrato de L-histidina monohidratado.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 1,3-1,7 mg/ml, 1,4-1,6 mg/ml, o 1,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, trehalosa está presente en una concentración de 70-100 mg/ml, o 70-90 mg/ml, o 70-85 mg/ml, o 75-85 mg/ml, o 80 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa es trehalosa dihidratada.

En algunas realizaciones de la invención, el poloxamer 188 está presente en una concentración de 0,9-1,1 mg/ml, o 0,95-1,05 mg/ml, o 1,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la prolina está presente en una concentración de 22-32 mg/ml, o 24-30 mg/ml, o 27 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la prolina es L-prolina.

En algunas realizaciones de la invención, la composición tiene un pH de 5,1-6,1, 5,2-6,0, 5,3-5,9, 5,4-5,8 o 5,5-5,7.

En algunas realizaciones de la invención, la composición tiene un pH de 5,6.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 80 mg/ml de trehalosa y 1,0 mg/ml de poloxamer 188, o

27 mg/ml de prolina;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 80 mg/ml de trehalosa y 1,0 mg/ml de poloxamer 188;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH 5,5 - 5,7.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 80 mg/ml de trehalosa dihidratada y 1,0 mg/ml de poloxamer 188;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 27 mg/ml de prolina;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica tiene un pH de 5,6.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de pembrolizumab, que se proporciona en forma seca (es decir, en polvo o en gránulos) para su reconstitución en un disolvente adecuado (por ejemplo, agua) antes de su administración. Dicha formulación puede prepararse, por ejemplo, mediante liofilización, es decir, un proceso conocido en la técnica como liofilización, que implica la congelación de un producto seguida de la eliminación del disolvente del material congelado.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de pembrolizumab producida por liofilización de cualquiera de las anteriores composiciones farmacéuticas de pembrolizumab. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden ser composiciones farmacéuticas acuosas o composiciones farmacéuticas liofilizadas (liofilizados).

Los liofilizados se utilizan para producir otras formas farmacéuticas. Por ejemplo, un liofilizado para producir una solución inyectable, un liofilizado para producir un concentrado para producir una solución inyectable. Los liofilizados se reconstituyen disolviéndolos en un disolvente adecuado, normalmente en agua para inyección. Además, las composiciones liofilizadas se reconstituyen primero en el volumen de disolvente necesario (normalmente en agua) y luego se diluyen en un disolvente adecuado (por ejemplo, una solución de glucosa al 5% o una solución de cloruro sódico al 0,9%).

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica de pembrolizumab se produce por liofilización de la composición farmacéutica de pembrolizumab según la presente invención.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica de pembrolizumab se produce por liofilización de la composición farmacéutica de pembrolizumab, que comprende:

(i) 5-50 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,087-0,432 mg/ml de histidina;

(iii) 0,464-0,931 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1-2 mg/ml de glicina;

(v) 70-130 mg/ml de trehalosa y 0,8-1,2 mg/ml de poloxamer 188, o

20-34 mg/ml de prolina; y

(vi) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica de pembrolizumab se produce por liofilización de la composición farmacéutica de pembrolizumab, que comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 80 mg/ml de trehalosa y 1,0 mg/ml de poloxamer 188;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica de pembrolizumab se produce por liofilización de la composición farmacéutica de pembrolizumab, que comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 80 mg/ml de trehalosa dihidratada y 1,0 mg/ml de poloxamer 188;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica de pembrolizumab se produce por liofilización de la composición farmacéutica de pembrolizumab, que comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 27 mg/ml de prolina;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica de pembrolizumab, a partir de la cual se produce la composición liofilizada, tiene un pH de 5,6.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de la anterior composición farmacéutica de pembrolizumab para tratar una neoplasia maligna o una enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones, la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de pembrolizumab que comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 80 mg/ml de trehalosa y 1,0 mg/ml de poloxamer 188;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7,

para tratar una neoplasia maligna o una enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones, la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de pembrolizumab que comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 80 mg/ml de trehalosa dihidratada y 1,0 mg/ml de poloxamer 188;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7,

para tratar una neoplasia maligna o una enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones, la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de pembrolizumab que comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 27 mg/ml de prolina;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7,

para tratar una neoplasia maligna o una enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica de pembrolizumab tiene un pH de 5,6.

En algunas realizaciones, la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de pembrolizumab producida por liofilización de la anterior composición farmacéutica de pembrolizumab para tratar una neoplasia maligna o una enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones, la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de pembrolizumab producida por liofilización de la composición farmacéutica de pembrolizumab que comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 80 mg/ml de trehalosa y 1,0 mg/ml de poloxamer 188;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7,

para tratar una neoplasia maligna o una enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones, la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de pembrolizumab producida por liofilización de la composición farmacéutica de pembrolizumab que comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 80 mg/ml de trehalosa dihidratada y 1,0 mg/ml de poloxamer 188;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7,

para tratar una neoplasia maligna o una enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones, la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de pembrolizumab producida por liofilización de la composición farmacéutica de pembrolizumab que comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 27 mg/ml de prolina;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7,

para tratar una neoplasia maligna o una enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica de pembrolizumab, a partir de la cual se produce la composición liofilizada, tiene un pH de 5,6.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de la anterior composición farmacéutica de pembrolizumab para producir un medicamento para tratar una neoplasia maligna o una enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones de la invención, la neoplasia maligna se selecciona del grupo: melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, linfoma mediastínico primario de células B grandes, cáncer urotelial, cáncer de estómago, neoplasias malignas con alta inestabilidad de microsatélites/deficiencia de reparación de emparejamientos de ADN (MMR), neoplasmas malignos, cáncer hepatocelular, cáncer de cuello uterino, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de células renales, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de piel de células escamosas, carcinoma de células basales, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de vesícula biliar, tumor cerebral maligno, glioblastoma, tumor con alta carga mutacional.

La enfermedad infecciosa puede estar causada por una infección viral, bacteriana o fúngica. En algunas realizaciones de la invención, la enfermedad infecciosa puede estar causada, por ejemplo, por el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, el virus del papiloma humano, el virus de Epstein-Barr, el citomegalovirus humano y el virus del herpes. Muchas de estas enfermedades pueden ser crónicas.

En algunas realizaciones de la invención, dicha composición farmacéutica de pembrolizumab de la presente invención está destinada a la administración parenteral.

En algunas realizaciones de la invención, dicha composición farmacéutica de pembrolizumab de la presente invención está destinada a la administración intramuscular, intravenosa o subcutánea.

En algunas realizaciones de la invención, dicha composición farmacéutica de pembrolizumab de la presente invención puede administrarse por vía intravenosa en forma de infusión.

La composición farmacéutica de pembrolizumab según la presente invención puede utilizarse tras su dilución. Para ello, el volumen requerido de la composición se transfiere de un vial a un recipiente de infusión que comprende una solución estéril de cloruro sódico al 0,9% o una solución estéril de dextrosa al 5%. La solución resultante se agita girando suavemente el recipiente de infusión.

La cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de pembrolizumab según la presente invención depende de la condición del sujeto, la gravedad de la condición, la terapia previa y la historia del paciente y la respuesta al agente terapéutico. La dosis adecuada puede ajustarse por decisión del médico que lo atiende, de modo que pueda administrarse al paciente una sola vez o mediante varias inyecciones.

En algunas realizaciones de la invención, el sujeto de tratamiento, o paciente, es un mamífero, preferentemente un sujeto humano. Dicho sujeto puede ser hombre o mujer, de cualquier edad.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden almacenarse en cualquier recipiente adecuado. Por ejemplo, un recipiente de vidrio o plástico, un vial, una ampolla, una jeringa, un cartucho o una botella del volumen deseado. Los envases pueden estar provistos de medios adicionales para la administración, como goteros o autoinyectores.

Una composición farmacéutica según la invención puede fabricarse, envasarse o venderse masivamente en forma de una dosis unitaria o de una multitud de dosis unitarias en forma de formulación lista. El término "dosis unitaria", tal como se utiliza aquí, se refiere a una cantidad discreta de una composición farmacéutica que contiene una cantidad predeterminada de un ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo suele ser igual a la dosis del ingrediente activo a ser administrada en un sujeto, o una porción conveniente de dicha dosis, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosis.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse como un único agente terapéutico o en combinación con otros agentes terapéuticos según sea necesario. Así, en una realización, los presentes métodos de tratamiento y/o profilaxis se utilizan en combinación con la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo. El otro agente activo puede administrarse antes, durante o después de la administración de las composiciones farmacéuticas según la presente invención. El otro agente activo puede administrarse como parte de la presente composición o, alternativamente, como una formulación separada.

Ejemplos

Métodos

1. Preparación de las muestras de pembrolizumab.

Las muestras de anticuerpos a una concentración de 5-50 mg/ml se prepararon en Stirred Cell (Millipore) a presión. Para ello, se colocó la formulación inicial de anticuerpos en una celda, se concentró la proteína bajo una corriente de aire comprimido hasta una concentración deseada bajo agitación continua, tras lo cual se añadió a la celda, de forma escalonada, un volumen al menos 10 veces mayor de una solución acuosa con la formulación objetivo que comprendía agentes tamponadores, agentes osmóticos y, si era necesario, estabilizadores solubles en agua

adicionales. Tras la diafiltración del anticuerpo, se continuó concentrando hasta una concentración superior a la deseada, se descargó de la célula y se midió la concentración exacta de proteínas mediante espectroscopia UV. A continuación, se añadieron a la muestra un concentrado de poloxamer 188 y una solución adecuada de excipientes para preparar una solución con proteínas a la concentración deseada.

Las muestras de proteínas con una concentración de 20 mg/ml o superior se prepararon en casetes Pellicon (Millipore) en modo de flujo tangencial. Para ello, se colocó la formulación inicial de anticuerpos en un tanque de diafiltración, se concentró la proteína hasta una concentración deseada, se suministró al sistema un volumen al menos 10 veces mayor de la solución con la formulación objetivo que comprende agentes tamponadores y, si es necesario, estabilizadores solubles en agua adicionales. Tras la diafiltración, se continuó concentrando hasta una concentración superior a la deseada, se descargó del sistema y se midió la concentración exacta de proteínas. A continuación, se añadieron a la muestra un concentrado de poloxamer 188 y una solución adecuada de excipientes para preparar una solución con proteínas a la concentración deseada.

Cuando se obtienen formulaciones que comprenden solubilizadores, por ejemplo, el poloxamer 188, los concentrados tensioactivos se añadieron al anticuerpo tras el diafiltrado y la concentración, con la dilución final del anticuerpo hasta la concentración objetivo con una solución de excipientes.

Durante el llenado aséptico en el recipiente final (por ejemplo, un recipiente de vidrio/plástico estéril, un vial o una jeringa), la solución de anticuerpos se filtró utilizando una membrana de esterilización de 0,22 µm.

2. Determinación de la concentración de proteínas en las muestras de ensayo

La concentración de proteínas se midió por espectroscopia UV a una longitud de onda de 280 nm en placas transparentes a la luz UV.

Cada muestra se diluyó con la solución apropiada de excipientes hasta una concentración de ~ 0,5 mg/ml. Se colocaron 150 µl de la muestra diluida en un pocillo de la placa de espectrofotometría UV. La densidad óptica de las soluciones en los pocillos de la placa se midió con un espectrofotómetro de placa a una longitud de onda de 280 nm. Se utilizó una solución apropiada de excipientes como solución de referencia.

La concentración (mg/ml) de proteínas (C) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$C = \frac{A(280) * b}{\varepsilon * l}$$, donde

A_{280} es un valor de densidad óptica a una longitud de onda de 280 nm;

ε es un coeficiente de extinción de la proteína de prueba;

b es el factor de dilución total de una muestra;

l es el espesor de la capa en un pocillo de la placa; para 150 µl, l = 0,42 cm.

3. Determinación de la temperatura de agregación de las proteínas mediante dispersión dinámica de la luz.

El punto de agregación de las proteínas de prueba (a una concentración de 1 a 5 mg/ml) se determinó utilizando el DynaPro Plate Reader II. Para ello, se colocaron 35 µl de la solución en un pocillo de una placa de polímero negra con fondo ópticamente transparente, que se calentó gradualmente en el instrumento mientras se medía constantemente la intensidad de la luz dispersa.

Ajustes de medición:

- Temperatura inicial de medición - 25 °C.
- Intensidad de la luz dispersa a θ = 158°.
- Número de mediciones por réplica - 3.
- Tiempo por medición - 5 s.
- Velocidad de calentamiento - 0,15 °C/min.
- Temperatura final - 80 °C.

La tendencia de la temperatura y el punto de agregación se determinaron con el software Dynamics V7.

4. Determinación del punto de fusión de las proteínas por fluorimetría de barrido diferencial.

Se añadió la tinción fluorescente Sypro Orange a la muestra de proteínas. La muestra se analizó en un amplificador CFX96 C1000 Touch Thermal Cycler en modo de tiempo real. El calentamiento fue de 25 a 85 °C, el canal de detección fue ROX. Se utilizó el software CFX Manager (Bio-Rad) para procesar los resultados.

5. Determinación del radio hidrodinámico de las partículas en solución mediante dispersión dinámica de la luz.

Para el análisis, se colocaron 35 µl de muestra en cada concentración en los pocillos de una placa de polímero negra con fondo ópticamente transparente. El análisis se realizó con el instrumento DynaPro Plate Reader II. Cada pocillo se analizó 10 veces. Los datos resultantes se procesaron en el software Dynamics V7.

6. Determinación del parámetro de interacción de difusión (k_D) mediante dispersión de luz dinámica.

Se produjeron varias soluciones de proteínas, desde 30 mg/ml hasta 0,94 mg/ml, mediante dilución escalonada. Se utilizaron soluciones apropiadas de excipientes como disolvente.

Para el análisis, se colocaron 35 µl de muestra en cada concentración en los pocillos de una placa de polímero negra con fondo ópticamente transparente. El análisis se realizó con el

instrumento DynaPro Plate Reader II. Cada pocillo se analizó 10 veces. Los datos resultantes se procesaron en el software Dynamics V7, donde se trazó la dependencia del coeficiente de difusión con la concentración de proteína en la solución y se determinó la inclinación de la línea para la dependencia resultante.

7. Determinación de la estabilidad térmica bajo tensión térmica de 50°C (TS50).

Las muestras de ensayo se dividieron en 2 alícuotas de 150 µl cada una y se colocaron en viales de vidrio separados: 1 vial por composición se almacenó en un refrigerador a 5 ± 3 °C, los demás viales se colocaron en un termostato y se incubaron a 50 °C durante 96 horas. Al seleccionar los puntos de control o tras el calentamiento, los viales se retiraron del termostato, se mantuvieron a temperatura ambiente durante unos 15 minutos y se transfirieron para su análisis.

8. Determinación de la estabilidad coloidal bajo agitación (SH800).

Las muestras de ensayo se dividieron en 2 alícuotas de 150 µl cada una y se colocaron en viales de vidrio, 1 vial por formulación se almacenó en un refrigerador a 5 ± 3 °C, los demás viales se colocaron en un agitador térmico y se agitaron a 800 rpm a 5 ± 3 °C durante 96 horas. Durante la selección de los puntos de control o luego de ser sometidos a estrés, los viales se retiraron del agitador térmico y se transfirieron para su análisis.

9. Determinación de la estabilidad coloidal bajo congelación-descongelación (CD (-20)).

Las muestras de ensayo se dividieron en 2 alícuotas y se colocaron en viales de plástico: 1 vial por formulación se almacenó en un refrigerador a 5 ± 3 °C, el resto de los viales se almacenaron en un congelador a no más de -18 °C hasta su completa congelación. A continuación, se sacaron los viales del congelador y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que el contenido se descongeló por completo; las soluciones se mezclaron con un vórtex y se volvieron a colocar en el congelador. Esto se repitió al menos 3 veces. Luego de ser sometidos a estrés, los viales se sacaron del congelador, se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que el contenido se descongeló por completo; las soluciones se mezclaron con un vórtex y se transfirieron para su análisis.

10. Determinación de la estabilidad bajo hidrólisis ácida (ácido).

Las muestras de ensayo se dividieron en 2 alícuotas y se colocaron en viales de polímero: 1 vial por formulación se almacenó en un refrigerador a 5 ± 3 °C (el control de entrada puede transferirse para su análisis una vez para todos los estudios al inicio del almacenamiento), el pH de los demás viales se ajustó a 3,5 ± 0,1 con una solución de ácido clorhídrico mientras se agitaba, después se transfirieron a un refrigerador para su almacenamiento a 5 ± 3 °C. Después de 1 hora, la hidrólisis se apagó mientras se agitaba añadiendo una solución de hidróxido de sodio hasta alcanzar el valor de pH inicial. A continuación, las soluciones se transfirieron para su análisis.

11. Determinación de la estabilidad bajo hidrólisis básica (Básica).

Las muestras de ensayo se dividieron en 2 alícuotas y se colocaron en viales de polímero: 1 vial por formulación se almacenó en un refrigerador a 5 ± 3 °C (el control de entrada puede transferirse para su análisis una vez para todos los estudios al inicio del almacenamiento), el pH de los demás viales se ajustó a 8,5 ± 0,1 con solución de hidróxido de sodio mientras se agitaba, después se transfirieron a un refrigerador para su almacenamiento a 5 ± 3 °C. Después de 1 hora, la hidrólisis se apagó mientras se agitaba añadiendo una solución de ácido clorhídrico hasta alcanzar el valor de pH inicial. A continuación, las soluciones se transfirieron para su análisis.

12. Envejecimiento acelerado.

Las muestras de prueba se dividieron en alícuotas separadas (una alícuota para el control de entrada - se permite transferir para el análisis una vez para todos los estudios al comienzo del almacenamiento) y se colocaron en viales de vidrio estériles separados: una parte de los viales para cada formulación se colocó en el refrigerador para su almacenamiento a 5 ± 3 °C (control de entrada), los viales restantes se colocaron en un termostato y se incubaron a 25 ± 2 °C durante 6 meses, seleccionando periódicamente puntos de control según el plan. Al seleccionar los puntos de control y tras el almacenamiento, los viales se retiraron del termostato y se transfirieron para su análisis.

13. Determinación de la pureza de la muestra mediante cromatografía líquida de alto rendimiento por exclusión de tamaño (SE HPLC).

Columna: Tosoh TSK-GelG3000SWXL 7,8 mm ID × 30 cm, 5 μm.

Precolumna: TSK-Gel Guard SW_{XL}, 6,0 mm ID × 4,0 cm, 7 μm, 300Å.

Temperatura de la columna: 25°C.

Caudal de la fase móvil: 0,5 ml/min.

Volumen de inyección: 25 μl.

Concentración de la muestra: 0,5 mg/ml.

Longitud de onda del detector: 214 y 360 nm.

Tiempo de elución: 30 min.

Fase móvil: Hidrogenofosfato disódico anhidro 14,2 mg/ml.
Cloruro de sodio 11,7 mg/ml.

El pH de la fase móvil se ajustó a 6,9 con ácido ortofosfórico.

14. Evaluación del perfil de la variante cargada en el capilar en el instrumento Caliper LabChip GX II.

El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit de variantes de carga de proteínas HT. Las muestras de ensayo se ajustaron a una concentración de proteínas de 1 mg/ml diluyendo o concentrando en filtros de centrífuga Amicon Ultra 10 kDa (Millipore) de 0,5 ml

(dependiendo de la concentración inicial de las muestras). El contenido de proteínas se siguió por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 280 nm.

Se añadieron 2 µl de solución de carboxipeptidasa a cada muestra resultante, y las muestras se incubaron durante 2 horas a una temperatura de 37 ± 2 ºC. Tras el tiempo especificado, las muestras se dializaron contra agua en tubos de centrífuga Amicon Ultra y se concentraron a 2 mg/ml.

Se cargó una placa de 96 pocillos con las cantidades, como están especificadas en las instrucciones, de solución tampón de etiquetado, solución de tinción de la mezcla y 25 µl de la muestra de ensayo, se colocó la placa en un lugar oscuro durante 10 minutos, se cargó cada pocillo con 60 µl de agua y se mezcló.

La placa con las soluciones se centrifugó utilizando un rotor de centrifugado de placas y se colocó en el instrumento Caliper LabChip GX II. En el análisis se utilizó un chip especial que se llenó con una solución tampón de corrida con un pH acorde a las instrucciones. Los resultados se procesaron con el software LabChip GX.

15. Determinación del perfil de la variante de carga mediante cromatografía líquida de intercambio iónico (IE HPLC).

Columna: ProPac WCX-10, 4×250 mm, tamaño de partícula: 10 µm (Thermo Scientific, USA).

Precolumna: ProPac WCX-10G, 4×50 mm, tamaño de partícula: 10 µm (Thermo Scientific, USA).

Eluyente A: Solución de ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico 20 mM, acetonitrilo 4%, pH = 7,0.

Eluyente B: Solución tampón de fosfato sódico 20 mM, NaCl 95 mM, acetonitrilo 4%, pH = 8,0.

Caudal: 0,6 ml/min - 1,0 ml/min.

Temperatura de la columna: 45 °C.

Temperatura del automuestreador: 5 °C.

Detector: UV, 280 nm.

Longitud de onda de referencia: 360 nm, ancho de banda de 100 nm

Volumen de la muestra: 80 µl.

Tiempo de cromatografía: 43 min.

La muestra de ensayo se diluyó hasta una concentración de 1,0 mg/ml y se trató con carboxipeptidasa B en una proporción de 100:1 durante 20 minutos a una temperatura de 37 ± 2 °C.

Modo de elución: Eluyente A del 100% al 80%, eluyente B del 0% al 20%.

16. Determinación de la pureza y de las impurezas relacionadas por electroforesis en gel de poliacrilamida capilar en presencia de/sin dodecil sulfato de sodio (EC red. y no red.).

La muestra se diluyó hasta una concentración de 4,0 mg/ml. Se colocaron 23 µl de la solución resultante en un microtubo de 1,5 ml; se añadieron 70 µl de tampón de muestra SDS-MW, 2 µl de patrón interno con un peso molecular de 10 kDa, 5 µl de solución de yodoacetamida 0,5M (EC no red.) o 5 µl de 2-mercaptoetanol (EC red.). La solución resultante se agitó durante 15 segundos, se centrifugó durante 5 segundos a una velocidad de 2800 rpm y se colocó en un termostato de estado sólido a 70°C durante 30 minutos. La solución se enfrió a temperatura ambiente.

Se utilizó el método de análisis SDS MW Separation - PA 800 plus.met en el software 32Karat.

Condiciones de la electroforesis en gel capilar:

Capilar: 50 µm × 30,2 cm

Longitud efectiva del capilar: 20,0 cm

Polaridad: inversa, entrada en el lado izquierdo (-), salida en el lado derecho (+)

Temperatura capilar: 25°C

Tiempo de análisis y tensión de separación: 35 min, 15 kV

Longitud de onda de detección: 220 nm.

17. Determinación de la actividad específica relativa.

La actividad específica se determinó mediante una prueba biológica de la capacidad de bloquear la inhibición de la activación dependiente de PD-L1 de la línea celular reportera Jurkat-PD1-NFAT basada en células T. Las muestras se procesaron utilizando la plataforma robótica Liquid Handling Arm (LiHa); como medio de ensayo (medio para la determinación cuantitativa) se utilizó RPMI-1640 con 25 mM de HEPES, con 24 mM de bicarbonato sódico, que contenía 2 mM de L-glutamina, 10% de FBS, 50 µg/ml de gentamicina.

La muestra de anticuerpo se diluyó con el medio de ensayo (medio para la determinación cuantitativa) hasta una concentración de 1 mg/ml y se colocó en la plataforma robótica. La plataforma robótica Liquid Handling Arm (LiHa) se utilizó para preparar tres diluciones independientes del estándar y de la muestra de ensayo a concentraciones de 1 000, 50, 10, 1, 0,5, 0,25, 0,1, 0,025, 0,01, 0,001 µg/ml utilizando el medio de ensayo. Se transfirieron las diluciones y el medio de ensayo a placas de cultivo, se añadió una suspensión de células Raji-PDL1 cl.3 que expresaban de forma estable PDL-1 a una concentración de (1,00 ± 0,1)×106 células/ml, una suspensión de línea celular reportera Jurkat-NFAT-PD1 cl.1 a una concentración de (1,67 ± 0,1)×106 células/ml y anticuerpos biespecíficos contra CD3/CD20. Las placas de cultivo se

colocaron en una incubadora de CO2 y se incubaron a una temperatura de (37 ± 1) °C en aire humidificado con un contenido de dióxido de carbono del 5 % durante 22-24 horas.

Tras el periodo de incubación, las placas de cultivo se mantuvieron a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos y se añadió el sustrato de luciferasa BioGlo. El nivel de luminiscencia se midió en unidades de luminiscencia relativa (RLU) utilizando un lector de microplacas y el software Magellan 7.2. Utilizando los resultados de la medición de la luminiscencia, construimos, para cada placa, curvas de cuatro parámetros optimizadas mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt para las muestras estándar y de prueba, y determinamos la actividad específica relativa de la muestra de prueba en relación con la muestra estándar.

18. Determinación de productos de oxidación por cromatografía líquida de alto rendimiento de interacciones hidrofóbicas (HPLC de interacción hidrofóbica).

Columna: TSKgel Phenyl-5PW 7,5 × 75 mm, tamaño de partícula: 10 µm (Tosoh Booscience, Japón).

Eluyente A: Solución tampón de fosfato sódico 5 mM, 2% de acetonitrilo, pH = 7,0.

Eluyente B: Solución tampón de fosfato sódico 5 mM, sulfato amónico 400 mM, acetonitrilo 4%, pH = 6,9.

Caudal: 0,5 ml/min.

Temperatura de la columna: 30 °C.

Temperatura del automuestreador: 5 °C.

Detector: UV, 280 nm, ancho de banda: 16 nm.

Longitud de onda de referencia: 360 nm, ancho de banda de 100 nm

Volumen de la muestra: 25 µl.

Tiempo de cromatografía: 82 min.

La muestra de ensayo se diluyó hasta una concentración de 3,0 mg/ml y se trató con carboxipeptidasa B en una proporción de 100:1 durante 20 minutos a una temperatura de 37 ± 2 °C.

Modo de elución: Eluyente A de 0% a 100%, eluyente B de 100% a 0%.

19. Determinación de la estabilidad bajo oxidación.

Las muestras de ensayo se dividieron en 2 alícuotas de 150 µl cada una y se colocaron en viales de vidrio separados: 1 vial por formulación se almacenó en un refrigerador a 5 ± 3 °C, se añadió peróxido de hidrógeno al resto de las muestras hasta alcanzar una concentración final de peróxido de hidrógeno del 0,1% en las muestras, las muestras se envejecieron durante 4 horas a (5 ± 3) °C. La oxidación se apagó añadiendo una cantidad equivalente de L-metionina.

20. Determinación de la fotoestabilidad.

Las muestras de ensayo se dividieron en dos alícuotas y se colocaron en viales de vidrio individuales. Como controles oscuros, utilizamos el producto en el envase secundario, bien envuelto con papel de aluminio. Todas las muestras se colocaron en una cámara climática con una fuente de luz, y se lanzó un programa de fotoestrés a 1,2 millones de lux-h y 200 W-h/m2 (dosis ICH×1). Al alcanzar el nivel de tensión deseado, todas las muestras se sacaron de la cámara y se transfirieron para su análisis.

21. Procesamiento de los resultados.

El cambio absoluto en los indicadores de calidad cuando se somete a tensiones se calculó mediante la fórmula:

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

El cambio absoluto en el perfil de la variante de carga se calculó mediante la fórmula (abs):

= |contenido de la fracción ácida antes del estrés - contenido de la fracción ácida después del estrés|.

+ |contenido de la fracción básica antes del estrés
- contenido de la fracción básica después del estrés|
+ | contenido de la fracción dominante antes del estrés
- contenido de la fracción dominante después del estrés|

Ejemplo 1. Selección del sistema tampón.

En este estudio, se seleccionaron dos sistemas tampón típicos, el de acetato y el de histidina, que son adecuados para la administración parenteral, como base de la composición farmacéutica. El estudio se realizó con un diseño experimental completo de dos factores con dos niveles y un punto central. El nivel de pH (de 5,0 a 6,5) y la concentración de agentes tampón (de 5 a 50 mM) se estudiaron como factores cuantitativos.

Para evaluar la idoneidad de los sistemas tampón, estudiamos el efecto de la naturaleza de la solución tampón en las estabilidades coloidales y conformacionales de la proteína. Como respuesta se determinaron la temperatura de agregación, el punto de fusión, el parámetro de interacción de difusión, los cambios de pureza y el perfil ácido-base tras el estrés térmico. Las composiciones farmacéuticas del ensayo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 - Formulaciones del ensayo

Designación	Formulación	
5 mM Acet pH 6,0	Pembrolizumab Acetato de sodio trihidratado Ácido acético glacial	1,5-5 mg/ml 0,644 mg/ml a pH 6,0

50 mM de Acet pH 6,0	Pembrolizumab Acetato de sodio trihidratado Ácido acético glacial	1,5-5 mg/ml 6,442 mg/ml a pH 6,0
50 mM de Acet pH 5,0	Pembrolizumab Acetato de sodio trihidratado Ácido acético glacial	1,5-5 mg/ml 0,436 mg/ml a pH 5,0
5 mM Acet pH 5,0	Pembrolizumab Acetato de sodio trihidratado Ácido acético glacial	1,5-5 mg/ml 4,355 mg/ml a pH 5,0
27,5 mM Acet pH 5,5	Pembrolizumab Acetato de sodio trihidratado Ácido acético glacial	1,5-5 mg/ml 3,177 mg/ml a pH 5,5
5 mM His pH 6,5	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado	1,5-5 mg/ml 0,589 mg/ml 0,252 mg/ml
50 mM His pH 6,5	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado	1,5-5 mg/ml 5,894 mg/ml 2,518 mg/ml
50 mM His pH 5,5	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado	1,5-5 mg/ml 1,864 mg/ml 7,963 mg/ml
5 mM His pH 5,5	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado	1,5-5 mg/ml 0,186 mg/ml 0,796 mg/ml
27,5 mM His pH 6,0	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado	1,5-5 mg/ml 2,133 mg/ml 2,882 mg/ml
Solución tampón Keytruda	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado	1,5-5 mg/ml 0,300 mg/ml 1,700 mg/ml

Estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad.

El parámetro de interacción de difusión (k_D) refleja el coeficiente de difusión de la muestra en función de la concentración de moléculas. Si el coeficiente de difusión disminuye con el aumento de la concentración ($k_D < 0$), la polidispersidad de la solución dada aumenta y se forman partículas más grandes en ella. Estas muestras tienen una baja solubilidad y tienden a agregarse, por lo que no se recomienda su uso.

La temperatura de agregación y el punto de fusión permiten evaluar la tendencia a la agregación de la proteína. Las muestras más estables son aquellas en las que la agregación de

partículas comienza a una temperatura más alta y en las que se forman partículas más pequeñas al calentarse.

Los resultados del estudio de la temperatura de agregación por el método 3, del punto de fusión por el método 4 y del parámetro de interacción de difusión por el método 6 se muestran en la Tabla 2. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 2 - Resultados del estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad

Designación de la formulación	Punto de fusión, °C			T agr, °C	k_D
	T ons	T1	T2		
5 mM Acet pH 6,0	54,1	64,3	67,3	62,09	-1,35E-02
50 mM de Acet pH 6,0	53,8	64,6	ninguno	58,8	6,44E-03
50 mM de 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	ninguno	61,65	1,35E-02
50 mM His pH 6,5	54,1	64,3	ninguno	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
Solución tampón Keytruda	48,1	59,5	67,0	63,7	8,06E-03

Determinación de la estabilidad térmica.

La estabilidad térmica se evaluó por el método 7. Antes y después del estrés térmico, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de la variante de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 5. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 3 - Resultados de la determinación de la estabilidad térmica

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			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 de 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 de Acet pH 5,0	5,4	5,9	0,52	5,07	99,43	-5,85	3,96	80,00	16,04	23,94

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			TS50 96H
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	2045
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
Solución tampón Keytruda	6,3	10,8	0,46	0,87	99,52	-1,81	3,68	81,43	14,89	11,32

Los datos resultantes se procesaron en el software Minitab, y se construyeron modelos para seleccionar la formulación que tiene el mayor efecto estabilizador. Sólo se utilizaron para la construcción del modelo las respuestas (indicadores de calidad) que estaban sujetas a un efecto significativo por parte de los factores (pH y molalidad de la solución tampón). Para otras respuestas no consideradas en el modelo de optimización, se asumió que no había diferencias estadísticamente significativas en el rango de factores estudiado. Basándose en los resultados de la optimización, se seleccionó una solución tampón de histidina de 5 mM con un pH de 5,6, que se prepara de la siguiente manera

L-histidina 0,221 mg/ml

Clorhidrato de L-histidina monohidratado 0,750 mg/ml

Al preparar una solución con contenidos específicos de L-histidina y clorhidrato de L-histidina monohidratado, el pH puede desviarse ligeramente del valor deseado y variar en el rango de pH de 5,5 - 5,7 (pH 5,6 ± 0,1).

Esta formulación mostró las mejores propiedades estabilizadoras entre todas las muestras de prueba. Según los resultados del modelo, se espera un cambio mínimo en el contenido del monómero (proteína) y de los agregados en la solución tampón de histidina bajo exposición térmica, y también se esperan valores altos de la temperatura de agregación y del parámetro de interacción de difusión. La composición óptima, en comparación con la solución tampón Keytruda, presenta un menor cambio en el contenido de monómero bajo exposición térmica, un

menor cambio en el contenido de agregados y un mayor parámetro de interacción de difusión, lo que indica una mayor estabilidad coloidal.

Ejemplo 2. Selección del agente osmótico.

Fórmulas de prueba.

Se estudiaron los excipientes adecuados para la administración parenteral para ser utilizados como agentes osmóticos. Las formulaciones de prueba se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4 - Formulaciones del ensayo

Designación	Formulación	
5 mM His, pH 5,6	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml
His + Tre 100 mg/ml	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado Trehalosa dihidratada	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 100 mg/ml
His + Sorb 50 mg/ml	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado Sorbitol	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 50 mg/ml
His + Prol 30 mg/ml	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado L-prolina	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 30 mg/ml
His + NaCl 9,0 mg/ml	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado Cloruro de sodio	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 9,0 mg/ml
Solución tampón Keytruda + Sacar.	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado Sacarosa	1,5-30 mg/ml 0,300 mg/ml 1,700 mg/ml 70,0 mg/ml

Estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad.

Los resultados del estudio de la temperatura de agregación por el método 3, del punto de fusión por el método 4 y del parámetro de interacción de difusión por el método 6 para la selección del agente osmótico se muestran en la Tabla 5. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 5 - Resultados del estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad

	Punto de fusión, °C	T agr, °C	k_D

Designación de la formulación	T ons	T1	T2		
5 mM His Buf, pH 5,6	50,8	60,4	67,3	64,33	1,89E+02
His + Tre 100 mg/ml	52,9	62,2	68,2	66,02	2,74E-02
His + Sorb 50 mg/ml	51,7	61,3	67,9	65,81	2,51E-02
His + Prol 30 mg/ml	50,5	61,6	67,6	65,18	3,05E-02
His + NaCl 9,0 mg/ml	46,3	58,3	65,2	58,24	-8,56E-03
Solución tampón Keytruda + Sacar.	50,5	59,2	67,0	63,44	9,22E-03

Determinación de la estabilidad térmica.

La estabilidad térmica se evaluó por el método 7. Antes y después del estrés térmico, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de la variante de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 6 - Resultados de la determinación de la estabilidad térmica

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			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 mg/ml	6,1	5,7	0,43	0,22	99,50	0,03	2,77	84,15	13,09	10,72
His + Sorb 50 mg/ml	5,2	5,4	0,44	0,41	99,53	-1,47	2,66	83,28	14,06	14,06
His + Prol 30 mg/ml	5,1	5,1	0,43	0,49	99,55	-1,51	2,59	84,19	13,23	11,30
His + NaCl 9,0 mg/ml	5,7	7,4	0,45	2,80	99,53	-4,11	2,73	83,05	14,23	11,46
Solución tampón Keytruda + Sacar.	6,2	5,8	0,42	0,94	99,54	-2,12	2,73	85,04	12,24	13,41

Determinación de la estabilidad bajo agitación.

La estabilidad bajo agitación se evaluó por el método 8. Antes y después de la agitación, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de la variante de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 7 - Resultados de la determinación de la estabilidad bajo agitación

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	SH80096H	CE	Δ SH80096H	CE	Δ SH80096H	CE			SH80096H
5 mM His Buf, pH 5,6	4,7	4,7	0,44	-0,01	99,53	0,02	2,81	83,30	13,90	1,35
His + Tre 100 mg/ml	6,1	5,7	0,43	-0,01	99,50	-0,02	2,77	84,15	13,09	0,50
His + Sorb 50 mg/ml	5,2	5,2	0,44	-0,01	99,53	0,03	2,66	83,28	14,06	2,39
His + Prol 30 mg/ml	5,1	4,9	0,43	-0,02	99,55	0,02	2,59	84,19	13,23	2,37
His + NaCl 9,0 mg/ml	5,7	5,5	0,45	-0,03	99,53	0,04	2,73	83,05	14,23	1,81
Solución tampón Keytruda + Sacar.	6,2	23,3	0,42	0,00	99,54	-0,02	2,73	85,04	12,24	2,13

Determinación de la estabilidad durante la congelación y descongelación.

La estabilidad bajo congelación-descongelación se evaluó por el método 9. Antes y después del estrés, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de la variante de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 8 - Resultados de la determinación de la estabilidad bajo congelación-descongelación

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	CD(-20) *5	CE	Δ CD(-20) *5	CE	Δ CD(-20) *5	CE			CD(-20) *5
5 mM 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 mg/ml	6,1	6,1	0,43	0,20	99,50	-0,22	2,77	84,15	13,09	1,43
His + Sorb 50 mg/ml	5,2	6,3	0,44	0,19	99,53	-0,18	2,66	83,28	14,06	1,05
His + Prol 30 mg/ml	5,1	5,7	0,43	0,06	99,55	-0,06	2,59	84,19	13,23	1,26
His + NaCl 9,0 mg/ml	5,7	5,8	0,45	0,20	99,53	-0,20	2,73	83,05	14,23	2,59
Solución tampón Keytruda + Sacar.	6,2	7,5	0,42	0,13	99,54	-0,12	2,73	85,04	12,24	2,36

Las formulaciones que comprenden trehalosa dihidratada y L-prolina mostraron las mejores propiedades estabilizadoras entre todas las muestras de la prueba. La muestra compuesta por trehalosa dihidratada mostró los mejores resultados en términos de temperatura de agregación y punto de fusión. Además, esta muestra mostró el menor cambio en los indicadores de calidad bajo exposición térmica, se observaron cambios menores bajo agitación. La muestra que comprende L-prolina también mostró uno de los mejores resultados para la temperatura de agregación y un resultado medio para el punto de fusión. La composición con L-prolina mostró resultados medios bajo exposición térmica, pequeños cambios en los indicadores de calidad bajo agitación, y el mejor resultado bajo congelación-descongelación.

La introducción de trehalosa dihidratada o de L-prolina, seleccionada para el siguiente paso, reduce la formación de agregados bajo el estrés térmico y de congelación. Además, las formulaciones seleccionadas presentan un ligero cambio de calidad bajo agitación.

Los agentes osmóticos seleccionados, en comparación con la formulación que contiene sacarosa, proporcionan una mayor estabilidad térmica; en particular, observamos un aumento del punto de fusión/temperatura de agregación, una menor tasa de formación de agregados bajo exposición térmica y un menor cambio en el contenido de monómero, y también observamos un menor cambio absoluto en el perfil ácido-base. La muestra que contenía trehalosa dihidratada en los excipientes mostró mejores resultados en cuanto al parámetro de interacción de difusión, lo que indica una mayor estabilidad y una menor tendencia a la agregación durante la concentración y la diafiltración. En comparación con la formulación que contiene sacarosa, las formulaciones estudiadas que contienen dihidrato de trehalosa, sorbitol o L-prolina muestran un aumento significativamente menor del radio hidrodinámico de las partículas bajo agitación y congelación, lo que indica la formación de grandes partículas de alto peso molecular.

Formulaciones de excipientes seleccionados para el siguiente paso:

His + Tre 100 mg/ml:	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	Trehalosa dihidratada	100 mg/ml
His + Prol 30 mg/ml:	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	L-prolina	30 mg/ml

Ejemplo 3. Examen de agentes osmóticos y estabilizadores.

Para el cribado de los agentes osmóticos y estabilizadores, se utilizaron excipientes adecuados para la administración parenteral. Las formulaciones de prueba se muestran en la Tabla 9. Las composiciones farmacéuticas que contienen pembrolizumab en las formulaciones de prueba se prepararon de acuerdo con el método 2.

Tabla 9 - Formulaciones del ensayo

Designación	Formulación	
His+Tre	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado Trehalosa dihidratada	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 100 mg/ml
His+Tre + Arginina h/c 100 mM	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado Trehalosa dihidratada Clorhidrato de arginina monohidratado	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 100 mg/ml 21,07 mg/ml
His+Tre + Glicina 100 mM	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado Trehalosa dihidratada Glicina	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 100 mg/ml 7,51 mg/ml
His+Tre + Metionina 10 mM	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado Trehalosa dihidratada Metionina	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 100 mg/ml 1,490 mg/ml
His+Prol	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado L-prolina	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 30 mg/ml

His+Prol + Arginina h/c 100 mM	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado L-prolina Clorhidrato de arginina monohidratado	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 30 mg/ml 21,07 mg/ml
His+Prol + Glicina 100 mM	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado L-prolina Glicina	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 30 mg/ml 7,51 mg/ml
His+Prol + Metionina 10 mM	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado L-prolina Metionina	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 30 mg/ml 1,490 mg/ml
Solución tampón Keytruda + Sacar.	Pembrolizumab L-histidina L-histidina h/c m/h Sacarosa	1,5-30 mg/ml 0,3 mg/ml 1,7 mg/ml 70 mg/ml
Keytruda pl	Pembrolizumab L-histidina L-histidina h/c m/h Sacarosa Polisorbato 80	1,5-30 mg/ml 0,3 mg/ml 1,7 mg/ml 70 mg/ml 0,2 mg/ml
His+Tre + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado Trehalosa dihidratada Polisorbato 80	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 100 mg/ml 0,5 mg/ml
His+Tre + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado Trehalosa dihidratada Poloxamer 188	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 100 mg/ml 0,5 mg/ml
His+Prol + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado L-prolina Polisorbato 80	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 30 mg/ml 0,5 mg/ml
His+Prol + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	Pembrolizumab L-histidina Clorhidrato de L-histidina monohidratado L-prolina Poloxamer 188	1,5-30 mg/ml 0,221 mg/ml 0,750 mg/ml 30 mg/ml 0,5 mg/ml

Estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad.

Los resultados del estudio de la temperatura de agregación por el método 3, del punto de fusión por el método 4 y del parámetro de interacción de difusión por el método 6 para la selección del agente osmótico se muestran en la Tabla 10. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 10 - Resultados del estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad

Designación de la formulación	Punto de fusión, °C			T agr, °C	k_D
	T ons	T1	T2		
His+Tre	51,7	61,9	68,2	66,05	8,23E-03
His+Tre + Arginina h/c 100 mM	47,2	59,5	64,9	60,59	-9,31E-03
His+Tre + Glicina 100 mM	52,3	62,5	68,5	66,42	1,10E-02
His+Tre + Metionina 10 mM	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 + Arginina h/c 100 mM	47,5	59,2	64,6	59,56	-5,11E-03
His+Prol + Glicina 100 mM	50,8	61,9	67,9	64,61	3,36E-02
His+Prol + Metionina 10 mM	50,8	61,3	67,3	64,34	3,24E-02
Solución tampón Keytruda + Sacar.	48,7	59,2	67,0	63,63	9,22E-03
Keytruda pl	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
His+Tre + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
His+Tre + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
His+Prol + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
His+Prol + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Determinación de la estabilidad térmica.

La estabilidad térmica se evaluó por el método 7. Antes y después del estrés térmico, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de la variante de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 11. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 11 - Resultados de la determinación de la estabilidad térmica

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			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 + Arginina h/c 100 mM	7,2	6,9	0,51	0,00	99,46	-0,02	2,81	85,41	11,79	1,51
His+Tre + Glicina 100 mM	5,6	5,5	0,47	-0,04	99,49	0,05	2,79	84,99	12,23	1,28
His+Tre + Metionina 10 mM	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 + Arginina h/c 100 mM	6,1	6	0,47	-0,01	99,48	-0,01	2,70	85,16	12,15	1,77
His+Prol + Glicina 100 mM	5,3	4,9	0,47	-0,03	99,49	0,02	2,94	85,17	11,90	3,41
His+Prol + Metionina 10 mM	5,2	4,9	0,46	-0,02	99,53	-0,03	2,79	84,52	12,70	0,57
Solución tampón Keytruda + Sacar.	6,1	5,9	0,45	-0,02	99,53	0,01	2,71	84,59	12,71	2,05
Keytruda pl	5,9	n/a	0,46	n/a	99,52	-0,03	3,11	84,03	12,87	1,41
His+Tre + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	5,5	n/a	0,54	n/a	99,43	n/a	3,23	83,61	13,17	n/a
His+Tre + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	5,5	n/a	0,46	n/a	99,51	n/a	3,12	84,62	12,27	n/a
His+Prol + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	5,1	n/a	0,52	n/a	99,43	n/a	3,15	84,86	12,00	n/a
His+Prol + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	4,9	n/a	0,46	n/a	99,51	n/a	2,96	84,73	12,31	n/a

Determinación de la estabilidad bajo hidrólisis ácida.

La estabilidad bajo hidrólisis ácida de las formulaciones sin poloxamer 188 se evaluaron por el método 10 con ajuste a pH 3,5 y envejecimiento durante 1 hora. Antes y después de la hidrólisis, determinamos: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de variante de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 12. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 12 - Resultados de la determinación de la estabilidad bajo hidrólisis ácida

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	Ácido 3,5 1H	CE	Δ Ácido 3,5 1H	CE	Δ Ácido 3,5 1H	CE			Ácido 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 + Arginina h/c 100 mM	7,2	8,9	0,51	4,99	99,46	-5,01	2,81	85,41	11,79	13,64
His+Tre + Glicina 100 mM	5,6	12,2	0,47	1,77	99,49	-1,77	2,79	84,99	12,23	5,97
His+Tre + Metionina 10 mM	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 + Arginina h/c 100 mM	6,1	6,6	0,47	5,27	99,48	-5,26	2,70	85,16	12,15	3,54
His+Prol + Glicina 100 mM	5,3	7,6	0,47	2,64	99,49	-2,63	2,94	85,17	11,90	1,20
His+Prol + Metionina 10 mM	5,2	7	0,46	0,76	99,53	-0,79	2,79	84,52	12,70	4,77
Solución tampón Keytruda + Sacar.	6,2	9,5	0,45	62,96	99,53	-64,53	2,71	84,59	12,71	23,15
Keytruda pl	5,9	n/a	0,46	n/a	99,52	n/a	3,11	84,03	12,87	n/a
His+Tre + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	5,5	n/a	0,54	n/a	99,43	n/a	3,23	83,61	13,17	n/a
His+Tre + Poloxamer	5,5	n/a	0,46	n/a	99,51	n/a	3,12	84,62	12,27	n/a

188 0,5 mg/ml										
His+Prol + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	5,1	n/a	0,52	n/a	99,43	n/a	3,15	84,86	12,00	n/a
His+Prol + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	4,9	n/a	0,46	n/a	99,51	n/a	2,96	84,73	12,31	n/a

Determinación de la estabilidad bajo hidrólisis básica.

La estabilidad bajo hidrólisis básica para las formulaciones sin poloxamer 188 se evaluaron por el método 11 con ajuste a pH 8,5 y envejecimiento durante 1 hora. Antes y después de la hidrólisis, determinamos: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de variante de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 13. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 13 - Resultados de la determinación de la estabilidad bajo hidrólisis básica

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	Básico 8,5 1H	CE	Δ Básico 8,5 1H	CE	Δ Básico 8,5 1H	CE			Básico 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 + Arginina h/c 100 mM	7,2	10,1	0,51	9,26	99,46	-9,30	2,81	85,41	11,79	13,95
His+Tre + Glicina 100 mM	5,6	9,4	0,47	6,14	99,49	-6,16	2,79	84,99	12,23	14,71
His+Tre + Metionina 10 mM	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 + Arginina h/c 100 mM	6,1	6,7	0,47	4,86	99,48	-4,88	2,70	85,16	12,15	6,32
His+Prol + Glicina 100 mM	5,3	6,1	0,47	1,98	99,49	-1,96	2,94	85,17	11,90	3,74
His+Prol + Metionina 10 mM	5,2	9,2	0,46	3,64	99,53	-3,67	2,79	84,52	12,70	6,18

Solución tampón Keytruda + Sacar.	6,2	20,7	0,45	10,36	99,53	-10,45	2,71	84,59	12,71	24,21
Keytruda pl	5,9	n/a	0,46	n/a	99,52	n/a	3,11	84,03	12,87	n/a
His+Tre + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	5,5	n/a	0,54	n/a	99,43	n/a	3,23	83,61	13,17	n/a
His+Tre + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	5,5	n/a	0,46	n/a	99,51	n/a	3,12	84,62	12,27	n/a
His+Prol + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	5,1	n/a	0,52	n/a	99,43	n/a	3,15	84,86	12,00	n/a
His+Prol + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	4,9	n/a	0,46	n/a	99,51	n/a	2,96	84,73	12,31	n/a

Determinación de la estabilidad bajo agitación.

La estabilidad bajo agitación se evaluó por el método 8. Antes y después del estrés, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de la variante de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 14. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 14 - Resultados de la determinación de la estabilidad bajo agitación

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE			SH800 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 + Arginina h/c 100 mM	7,2	7	0,51	-0,06	99,46	0,06	2,81	85,41	11,79	0,18
His+Tre + Glicina 100 mM	5,6	5,9	0,47	-0,04	99,49	0,03	2,79	84,99	12,23	1,03
His+Tre + Metionina 10 mM	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 + Arginina h/c 100 mM	6,1	5,9	0,47	-0,03	99,48	0,03	2,70	85,16	12,15	0,46
His+Prol + Glicina 100 mM	5,3	4,9	0,47	-0,03	99,49	0,02	2,94	85,17	11,90	0,93
His+Prol + Metionina 10 mM	5,2	4,9	0,46	-0,02	99,53	-0,01	2,79	84,52	12,70	0,85
Solución tampón Keytruda + Sacar.	6,2	10,5	0,45	-0,02	99,53	0,01	2,71	84,59	12,71	0,04
Keytruda pl	5,9	5,7	0,46	-0,02	99,52	0,02	3,11	84,03	12,87	0,13
His+Tre + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	5,5	5,5	0,54	-0,01	99,43	0,00	3,23	83,61	13,17	0,64
His+Tre + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	5,5	5,4	0,46	0,00	99,51	-0,03	3,12	84,62	12,27	0,47
His+Prol + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	5,1	4,9	0,52	-0,01	99,43	0,00	3,15	84,86	12,00	5,23
His+Prol + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	4,9	4,9	0,46	-0,02	99,51	-0,01	2,96	84,73	12,31	5,28

Determinación de la estabilidad durante la congelación y descongelación.

La estabilidad bajo congelación-descongelación se evaluó por el método 9. Antes y después del estrés, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de la variante de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 15. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 15 - Resultados de la determinación de la estabilidad bajo congelación-descongelación

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	CD (-20) *3	CE	Δ CD	CE	Δ CD	CE			CD

				(-20) *3		(-20) *3				(-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 + Arginina h/c 100 mM	7,2	7,1	0,51	0,13	99,46	-0,14	2,81	85,41	11,79	2,84
His+Tre + Glicina 100 mM	5,6	6	0,47	0,15	99,49	-0,14	2,79	84,99	12,23	2,85
His+Tre + Metionina 10 mM	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 + Arginina h/c 100 mM	6,1	6	0,47	0,08	99,48	-0,08	2,70	85,16	12,15	1,84
His+Prol + Glicina 100 mM	5,3	5,3	0,47	0,12	99,49	-0,10	2,94	85,17	11,90	3,34
His+Prol + Metionina 10 mM	5,2	5,3	0,46	0,09	99,53	-0,13	2,79	84,52	12,70	2,04
Solución tampón Keytruda + Sacar.	6,2	6,6	0,45	0,14	99,53	-0,15	2,71	84,59	12,71	2,62
Keytruda pl	5,9	5,9	0,46	0,00	99,52	0,00	3,11	84,03	12,87	3,06
His+Tre + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	5,5	5,4	0,54	0,03	99,43	-0,04	3,23	83,61	13,17	4,29
His+Tre + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	5,5	5,4	0,46	0,02	99,51	-0,02	3,12	84,62	12,27	3,98
His+Prol + Polisorbato 80 0,5 mg/ml	5,1	5,2	0,52	0,02	99,43	-0,03	3,15	84,86	12,00	6,69
His+Prol + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	4,9	4,9	0,46	0,01	99,51	0,00	2,96	84,73	12,31	4,46

Entre las muestras de ensayo se pueden distinguir las siguientes formulaciones en términos de estabilidad:

1. His+Tre + Glicina 100 mM	Pembrolizumab	1,5-30 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	Trehalosa dihidratada	100 mg/ml
	Glicina	7,51 mg/ml
2. His+Tre + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	Pembrolizumab	1,5-30 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	Trehalosa dihidratada	100 mg/ml
	Poloxamer 188	0,5 mg/ml
3. His+Prol	Pembrolizumab	1,5-30 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	L-prolina	30 mg/ml
4. His+Prol + Glicina 100 mM	Pembrolizumab	1,5-30 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	L-prolina	30 mg/ml
	Glicina	7,51 mg/ml
5. His+Prol + Glicina 100 mM + Poloxamer 188 0,5 mg/ml	Pembrolizumab	1,5-30 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	L-prolina	30 mg/ml
	Glicina	7,51 mg/ml
	Poloxamer 188	0,5 mg/ml

Las formulaciones que contienen dihidrato de trehalosa, las composiciones de dihidrato de trehalosa en combinación con glicina, así como las composiciones con L-prolina, así como las composiciones con L-prolina en combinación con glicina o metionina fueron seleccionadas para su desarrollo posterior, ya que mostraron resultados positivos de estabilidad bajo estrés.

Todas las formulaciones con trehalosa dihidratada mostraron un mayor contenido de la fracción básica en comparación con la de L-prolina. Entre las formulaciones que contenían trehalosa dihidratada, la formulación con glicina mostró los mejores resultados. Observamos el efecto positivo de la glicina sobre la temperatura de agregación y el punto de fusión, así como sobre el parámetro de interacción de difusión. En caso de estrés térmico, la adición de glicina a la formulación mostró ligeras mejoras. La adición de glicina a la formulación mostró mejoras en la pureza y el perfil ácido-base antes y después del estrés. En comparación con la muestra de la formulación de excipientes de Keytruda sin tensioactivos añadidos, observamos un aumento significativo del punto de fusión y de la temperatura de agregación, así como un cambio significativamente menor de la pureza y del perfil ácido-base bajo hidrólisis ácida y básica.

Entre las formulaciones que contienen tensioactivos, se observó el efecto positivo del poloxamer 188. Estas composiciones mostraron un cambio menor en el perfil de pureza y variante de carga bajo agitación y congelación. En consecuencia, se seleccionó el Poloxamer 188 para utilizarlo como tensioactivo en el siguiente paso.

Ejemplo 4. Determinación de los factores cuantitativos críticos de la formulación de excipientes.

El estudio se realizó en un diseño experimental factorial de cuatro factores con dos niveles y un punto central. Se estudiaron como factores cuantitativos la concentración de proteínas (de 10 a 40 mg/ml), el pH (de 5,1 a 6,1), la concentración de agente osmótico (de 70 a 130 mg/ml), la concentración de L-glicina (de 1,5 a 15 mg/ml) y la concentración de poloxamer 188 (de 0,10 a 1,0 mg/ml). Las fórmulas del ensayo se enumeran en la tabla 16.

Tabla 16 - Formulaciones del ensayo

Designación	Concentración de proteínas, mg/ml	Solución tampón	Conc. de agente osmótico, mg/ml	Conc. de L-glicina, mg/ml	Conc. de Poloxamer 188 (KOLL), mg/ml
Pembro 10 His 5,1+Tre 70+Gly 15+ KOLL 1,0	10	5 mM His pH 5,1	70 Trehalosa dihidratada	15,01	1,00
Pembro 10 His 5,1+Tre 130+Gly 15+ KOLL 0,1	10	5 mM His pH 5,1	130 Trehalosa dihidratada	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 Trehalosa dihidratada	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 Trehalosa dihidratada	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 Trehalosa dihidratada	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 Trehalosa dihidratada	8,25	0,55
Pembro 40 His 6,1+Tre 70+Gly 15+ KOLL 0,1	40	5 mMHis pH 6,1	70 Trehalosa dihidratada	15,01	0,10

Designación	Concentración de proteínas, mg/ml	Solución tampón	Conc. de agente osmótico, mg/ml	Conc. de L-glicina, mg/ml	Conc. de Poloxamer 188 (KOLL), mg/ml
Pembro 10 His 6,1+Tre 70+Gly 1,5+ KOLL 0,1	10	5 mM His pH 6,1	70 Trehalosa dihidratada	1,50	0,10
Pembro 40 His 6,1+Tre 130+Gly 15+ KOLL 1,0	40	5 mM His pH 6,1	130 Trehalosa dihidratada	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 Trehalosa dihidratada	1,50	1,00
Pembro 25 His 5,6 +Prol 30 + Gly 8,25	25	5 mM His pH 5,6	30 L-prolina	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-prolina	8,25	0,55

En la Tabla 16, las soluciones tampón se refieren a las siguientes formulaciones descritas en la Tabla 17.

Tabla 17 - Formulaciones de soluciones tampón

5 mM His, pH 5,1	L-histidina	0,087 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,931 mg/ml
5 mM His, pH 5,6	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
5 mM His, pH 6,1	L-histidina	0,432 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,464 mg/ml

Estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad.

Los resultados del estudio de la temperatura de agregación por el método 3, del punto de fusión por el método 4 y del parámetro de interacción de difusión por el método 6 para la selección del agente osmótico se muestran en la Tabla 18. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Cuadro 18 - Resultados del estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad

Designación de la formulación	Punto de fusión, °C		k_D

	T ons	T1	T2	T agr, °C	
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	ninguno	66,26	1,20E-02
Pembro 10 His 6,1+ Tre 70+Gly 1,5+ KOLL 0,1	53,2	64	ninguno	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

Determinación de la estabilidad térmica.

La estabilidad térmica se evaluó por el método 7. Antes y después del estrés térmico, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de la variante de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 19. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 19 - Resultados de la determinación de la estabilidad térmica

Determinación de la estabilidad bajo agitación.

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			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 1,5+ KOLL 0,10	3,8	4,1	0,57	0,85	99,39	-0,92	3,09	82,03	14,88	9,60
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

La estabilidad bajo agitación se evaluó por el método 8. Antes y después del estrés, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de la variante de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 20. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 20 - Resultados de la determinación de la estabilidad bajo agitación

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	SH80096H	CE	Δ SH80096H	CE	Δ SH80096H	CE			SH80096H
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	5,2	5,4	0,63	0,02	99,34	-0,03	2,38	84,78	12,84	1,93

130+Gly 15+ KOLL 1,0										
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

Determinación de la estabilidad durante la congelación y descongelación.

La estabilidad bajo congelación-descongelación se evaluó por el método 9. Antes y después del estrés, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de la variante de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 21. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 21 - Resultados de la determinación de la estabilidad bajo congelación-descongelación

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	CD (-20) *3	CE	Δ CD (-20) *3	CE	Δ CD (-20) *3	CE			CD (-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	4,4	4,4	0,60	0,02	99,36	-0,01	2,87	84,12	13,01	1,14

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %			
			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Δ abs
	CE	CD (-20) *3	CE	Δ CD (-20) *3	CE	Δ CD (-20) *3	CE			CD (-20) *3
8,25+ KOLL 0,55										
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 70+Gly 1,5+ KOLL 0,1	5	5	0,60	0,06	99,39	-0,07	2,85	83,68	13,47	0,50
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

Los resultados se utilizaron para construir el modelo en el software Minitab. Las concentraciones de L-glicina/poloxamer 188 no tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la estabilidad del pembrolizumab. Según los resultados de la optimización, la concentración recomendada de L-glicina es de 15 mg/ml, la concentración recomendada de poloxamer 188 es de 1,0 mg/ml, la concentración recomendada de trehalosa dihidratada es de 84,5 mg/ml. Sin embargo, para garantizar la osmolalidad fisiológica de la composición, el contenido de L-glicina se redujo a 1,5 mg/ml, y el de trehalosa dihidratada a 80 mg/ml. La solución tampón, la concentración y el pH de la misma fueron seleccionados anteriormente, los resultados se muestran en el Ejemplo 1. Este ejemplo confirmó su efecto estadísticamente significativo sobre la estabilidad del pembrolizumab. Bajo el estrés térmico, los surfactantes pueden causar la formación de impurezas de alto peso molecular. Si se excluye el estrés térmico del modelo, se puede concluir que el aumento de la concentración de poloxamer 188 tiene un efecto positivo en la estabilidad del pembrolizumab. Según los resultados, la concentración óptima de poloxamer 188 es de 1,0 mg/ml.

Así, la formulación final seleccionada es la siguiente:

Pembrolizumab	1,5-40 mg/ml
L-histidina	0,221 mg/ml
Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
Trehalosa dihidratada	80 mg/ml
Glicina	1,5 mg/ml
Poloxamer 188	1,0 mg/ml

Ejemplo 5. Determinación de la estabilidad de la formulación final en condiciones de estrés

Para las pruebas de estabilidad en condiciones de estrés, se seleccionaron la formulación final de Pembrolizumab y la formulación de excipientes de Keytruda. Las formulaciones del ensayo se muestran en la Tabla 22. Las composiciones farmacéuticas que contienen pembrolizumab en las formulaciones de prueba se prepararon de acuerdo con el método 2.

Tabla 22 - Formulaciones del ensayo

Pembro	Pembrolizumab	1,5-30 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidrato	0,750 mg/ml
	Trehalosa d/h	80,0 mg/ml
	Glicina	1,5 mg/ml
	Poloxamer 188	1,0 mg/ml
Keytruda pl	Pembrolizumab	1,5-30 mg/ml
	L-histidina	0,3 mg/ml
	L-histidina h/c m/h	1,7 mg/ml
	Sacarosa	70 mg/ml
	Polisorbato 80	0,2 mg/ml

Determinación de la estabilidad térmica.

La estabilidad térmica se evaluó por el método 7 durante 10 días. Antes y después del estrés térmico, determinamos la pureza por el método SE HPLC (método 13), el perfil de la variante cargada por el método IE HPLC (método 15), el contenido de productos de oxidación por el método HPLC de interacción hidrofóbica (método 18), el radio hidrodinámico por el método 5. Los resultados se muestran en la Tabla 23. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 23 - Resultados de la determinación de la estabilidad térmica

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm	Pureza, SE HPLC		HPLC de interacción hidrofóbica	
		Agregados, %	Monómero, %	Variantes de óxido, pico 1+2	Variantes de óxido, pico 3.

	CE	TS50	CE	Δ TS50	CE	Δ TS50	CE	Δ TS50	CE	Δ TS50
Pembro	4,2	4,7	0,15	0,02	99,85	-0,18	7,9	0,74	0	0,50
Keytruda pl	5,0	6,1	0,14	0,07	99,86	-0,25	6,22	12,15	0	1,13

Designación de la formulación	Perfil de la variante cargada, IE HPLC					
	Ácido, %		Base, %		Alc., %	
	CE	Δ TS50	CE	Δ TS50	CE	Δ TS50
Pembro	13,81	21,92	73,97	-22,13	12,22	0,21
Keytruda pl	15,59	22,36	72,79	-23,74	11,62	1,38

Determinación de la estabilidad bajo agitación.

La estabilidad bajo agitación se evaluó por el método 8. Antes y después de la agitación, se determinó la pureza por el método SE HPLC 13, el perfil de la variante cargada por el método IE HPLC (método 15), el contenido de productos de oxidación por el método HPLC de interacción hidrofóbica (método 18), el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 24. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 24 - Resultados de la determinación de la estabilidad bajo agitación

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				HPLC de interacción hidrofóbica			
			Agregados, %		Monómero, %		Variantes de óxido, pico 1+2		Variantes de óxido, pico 3.	
	CE	SH800	CE	Δ SH800	CE	Δ SH800	CE	Δ SH800	CE	Δ SH800
Pembro	4,2	0,1	0,15	0,04	99,85	-0,04	7,9	n/a	0	n/a
Keytruda pl	5,0	0,0	0,14	0,04	99,86	-0,04	6,22	n/a	0	n/a

Designación de la formulación	Perfil de la variante cargada, IE HPLC					
	Ácido, %		Base, %		Alc., %	
	CE	Δ SH800	CE	Δ SH800	CE	Δ SH800
Pembro	13,81	0,18	73,97	-0,16	12,22	-0,02
Keytruda pl	15,59	-1,28	72,79	1,65	11,62	-0,36

Determinación de la estabilidad durante la congelación y descongelación.

La estabilidad bajo congelación-descongelación se evaluó por el método 9. Antes y después del estrés, se determinó la pureza por el método 13 de SE HPLC, el perfil de variantes cargadas por el método 15 de IE HPLC, el contenido de productos de oxidación por el método de

HPLC de interacción hidrofóbica (método 18), el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 25. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 25 - Resultados de la determinación de la estabilidad bajo congelación-descongelación

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				HPLC de interacción hidrofóbica			
			Agregados, %		Monómero, %		Variantes de óxido, pico 1+2		Variantes de óxido, pico 3.	
	CE	CD(-20)	CE	Δ CD (-20)	CE	Δ CD (-20)	CE	Δ CD (-20)	CE	Δ CD (-20)
Pembro	4,2	-0,1	0,15	-0,01	99,85	0,01	7,9	n/a	0	n/a
Keytruda pl	5,0	-0,1	0,14	0,01	99,86	-0,01	6,22	n/a	0	n/a

Designación de la formulación	Perfil de la variante cargada, IE HPLC					
	Ácido, %		Base, %		Alc., %	
	CE	Δ CD(-20)*3	CE	Δ CD(-20)*3	CE	Δ CD(-20)*3
Pembro	13,81	-0,05	73,97	0,06	12,22	-0,01
Keytruda pl	15,59	-0,09	72,79	0,16	11,62	-0,07

Determinación de la estabilidad bajo hidrólisis ácida.

La estabilidad bajo hidrólisis ácida se evaluó por el método 9. Antes y después del estrés, se determinó la pureza por el método 13 de SE HPLC, el perfil de variantes cargadas por el método 15 de IE HPLC, el contenido de productos de oxidación por el método de HPLC de interacción hidrofóbica (método 18), el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 26. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 26 - Resultados de la determinación de la estabilidad bajo hidrólisis ácida

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				HPLC de interacción hidrofóbica			
			Agregados, %		Monómero, %		Variantes de óxido, pico 1+2		Variantes de óxido, pico 3.	
	CE	pH ácido 4,0	CE	Δ Ácido pH 4,0	CE	Δ Ácido pH 4,0	CE	Δ Ácido pH 4,0	CE	Δ Ácido pH 4,0
Pembro	4,2	2,00	0,15	0,11	99,85	-0,11	7,9	0,52	0	0,00
Keytruda pl	5,0	1,33	0,14	0,12	99,86	-0,12	6,22	0,19	0	0,00

Designación de la formulación	Perfil de la variante cargada, IE HPLC					
	Ácido, %		Base, %		Alc., %	
	CE	Δ Ácido pH 4,0	CE	Δ Ácido pH 4,0	CE	Δ Ácido pH 4,0
Pembro	13,81	-0,11	73,97	0,20	12,22	-0,09
Keytruda pl	15,59	-0,17	72,79	0,22	11,62	-0,04

Determinación de la estabilidad bajo hidrólisis básica.

La estabilidad bajo hidrólisis básica se evaluó por el método 9. Antes y después del estrés, se determinó la pureza por el método 13 de SE HPLC, el perfil de variantes cargadas por el método 15 de IE HPLC, el contenido de productos de oxidación por el método de HPLC de interacción hidrofóbica (método 18), el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 27. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 27 - Resultados de la determinación de la estabilidad bajo hidrólisis básica

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				HPLC de interacción hidrofóbica			
			Agregados, %		Monómero, %		Variantes de óxido, pico 1+2		Variantes de óxido, pico 3.	
	CE	pH básico 8,0	CE	Δ Básico pH 8,0	CE	Δ Básico pH 8,0	CE	Δ Básico pH 8,0	CE	Δ Básico pH 8,0
Pembro	4,2	2,2	0,15	0,18	99,85	-0,24	7,9	0,18	0	0,00
Keytruda pl	5,0	2,1	0,14	0,47	99,86	-0,47	6,22	0,11	0	0,00

Designación de la formulación	Perfil de la variante cargada, IE HPLC					
	Ácido, %		Base, %		Alc., %	
	CE	Δ Básico pH 8,0	CE	Δ Básico pH 8,0	CE	Δ Básico pH 8,0
Pembro	13,81	0,28	73,97	-0,07	12,22	-0,20
Keytruda pl	15,59	0,35	72,79	0,06	11,62	-0,42

Determinación de la estabilidad bajo oxidación.

La estabilidad bajo oxidación se evaluó por el método 9. Antes y después del estrés, se determinó la pureza por el método 13 de SE HPLC, el perfil de variantes cargadas por el método 15 de IE HPLC, el contenido de productos de oxidación por el método de HPLC de interacción hidrofóbica (método 18), el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 28. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 28 - Resultados de la determinación de la estabilidad bajo oxidación

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				HPLC de interacción hidrofóbica			
			Agregados, %		Monómero, %		Variantes de óxido, pico 1+2		Variantes de óxido, pico 3.	
	CE	Ox 0,1%	CE	Δ Ox 0,1%	CE	Δ Ox 0,1%	CE	Δ Ox 0,1%	CE	Δ Ox 0,1%
Pembro	4,2	2,2	0,31	-0,02	99,63	0,02	7,89	No está sujeto a marcado	0	No está sujeto a marcado
Keytruda pl	5,0	2,1	0,30	-0,01	99,65	0,00	7,12		0	

Designación de la formulación	Perfil de la variante cargada, IE HPLC					
	Ácido, %		Base, %		Alc., %	
	CE	Δ Ox 0,1%	CE	Δ Ox 0,1%	CE	Δ Ox 0,1%
Pembro	13,41	-3,07	74,75	-27,21	11,85	30,28
Keytruda pl	15,34	-3,74	73,76	-29,43	10,91	33,17

Determinación de la fotoestabilidad.

La estabilidad bajo oxidación se evaluó por el método 9. Antes y después del estrés, se determinó la pureza por el método 13 de SE HPLC, el perfil de variantes cargadas por el método 15 de IE HPLC, el contenido de productos de oxidación por el método de HPLC de interacción hidrofóbica (método 18), el radio hidrodinámico por el método 6. Los resultados se muestran en la Tabla 29. Los mejores resultados tienen un tono de color más claro.

Tabla 29 - Resultados de la determinación de la fotoestabilidad

Designación de la formulación	Radio hidrodinámico, nm		Pureza, SE HPLC				HPLC de interacción hidrofóbica			
			Agregados, %		Monómero, %		Variantes de óxido, pico 1+2		Variantes de óxido, pico 3.	
	CE	UV	CE	Δ UV	CE	Δ UV	CE	Δ UV	CE	Δ UV
Pembro	4,3	0,1	0,16	0,17	99,84	-0,16	8,60	1,75	0	0
Keytruda pl	5,0	0,1	0,17	0,18	99,83	-0,18	6,33	5,59	0	0

Designación de la formulación	Perfil de la variante cargada, IE HPLC					
	Ácido, %		Base, %		Alc., %	
	CE	Δ UV	CE	Δ UV	CE	Δ UV
Pembro	12,31	3,03	75,71	-6,10	11,98	3,07
Keytruda pl	14,00	2,39	74,78	-6,79	11,23	4,39

Según los resultados de las pruebas de estabilidad bajo tensión, la formulación del excipiente de Pembrolizumab, en comparación con la de Keytruda, mostró un menor cambio en los indicadores de calidad bajo tensión térmica, concretamente, un menor cambio en el radio hidrodinámico, un menor aumento de los agregados y cambios en el contenido de monómeros, una tendencia significativamente menor a formar formas oxidadas y un menor cambio en el perfil de variantes cargadas.

En el caso de la agitación y la congelación, se observó un cambio menor en el perfil de la variante cargada tras el estrés.

A su vez, cuando se somete a hidrólisis ácida, se observa un menor aumento de los agregados y un cambio en el contenido de monómeros, así como un menor cambio en el contenido de la fracción básica. Cuando se somete a hidrólisis básica, la proteína de la formulación de Pembrolizumab tiene menos tendencia a formar agregados, a cambiar el contenido de monómeros y a cambiar el perfil de variantes cargadas.

Cuando se sometió a fotoestrés, se observó una tendencia significativamente menor a la oxidación en comparación con la formulación de excipientes de Keytruda, así como un menor cambio en el contenido de monómero, un menor aumento de los agregados y un menor cambio en el perfil de variantes cargadas.

Ejemplo 6. Determinación de la estabilidad bajo envejecimiento acelerado a una temperatura de 37 ± 2 °C.

Para confirmar previamente la estabilidad de la formulación seleccionada, se la sometió a un envejecimiento acelerado a una temperatura de 37 ± 2 °C.

Se prepararon composiciones farmacéuticas en el rango de concentración de proteínas (de 25 a 50 mg/ml), pH (de 5,1 a 6,1), concentración de dihidrato de trehalosa (de 70 a 90 mg/ml), concentración de glicina (de 1,0 a 2,0 mg/ml) y concentración de poloxamer 188 (de 0,8 a 1,2 mg/ml) por el método 1 y se almacenaron para la prueba de estabilidad a una temperatura de 37 ± 2 °C.

Las formulaciones del ensayo se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30 - Formulaciones del ensayo

Pembro 25 mg/ml formul1	Pembrolizumab	25,0 mg/ml
	L-histidina	0,087 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,931 mg/ml
	Trehalosa d/h	90 mg/ml
	Glicina	1,0 mg/ml
	Poloxamer 188	0,8 mg/ml

Pembro 25 mg/ml formul2	Pembrolizumab	25,0 mg/ml
	L-histidina	0,087 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,931 mg/ml
	Trehalosa d/h	90 mg/ml
	Glicina	2,0 mg/ml
	Poloxamer 188	1,2 mg/ml
Pembro 25 mg/ml formul3	Pembrolizumab	25,0 mg/ml
	L-histidina	0,087 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,931 mg/ml
	Trehalosa d/h	70 mg/ml
	Glicina	2,0 mg/ml
	Poloxamer 188	0,8 mg/ml
Pembro 25 mg/ml formul4	Pembrolizumab	25,0 mg/ml
	L-histidina	0,087 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,931 mg/ml
	Trehalosa d/h	70 mg/ml
	Glicina	1,0 mg/ml
	Poloxamer 188	1,2 mg/ml
Pembro 50 mg/ml formul5	Pembrolizumab	50,0 mg/ml
	L-histidina	0,087 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,931 mg/ml
	Trehalosa d/h	90 mg/ml
	Glicina	2,0 mg/ml
	Poloxamer 188	0,8 mg/ml
Pembro 50 mg/ml formul6	Pembrolizumab	50,0 mg/ml
	L-histidina	0,087 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,931 mg/ml
	Trehalosa d/h	70 mg/ml
	Glicina	1,0 mg/ml
	Poloxamer 188	0,8 mg/ml
Pembro 50 mg/ml formul7	Pembrolizumab	50,0 mg/ml
	L-histidina	0,087 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,931 mg/ml
	Trehalosa d/h	90 mg/ml

	Glicina	1,0 mg/ml
	Poloxamer 188	1,2 mg/ml
Pembro 50 mg/ml formul8	Pembrolizumab	50,0 mg/ml
	L-histidina	0,087 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,931 mg/ml
	Trehalosa d/h	70 mg/ml
	Glicina	2,0 mg/ml
	Poloxamer 188	1,2 mg/ml
Pembro 37,5 mg/ml formul9	Pembrolizumab	37,5 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	Trehalosa d/h	80,0 mg/ml
	Glicina	1,5 mg/ml
	Poloxamer 188	1,0 mg/ml
Pembro 37,5 mg/ml formul10	Pembrolizumab	37,5 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	Trehalosa d/h	80,0 mg/ml
	Glicina	1,5 mg/ml
	Poloxamer 188	1,0 mg/ml
Pembro 25 mg/ml formul11	Pembrolizumab	25,0 mg/ml
	L-histidina	0,432 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,464 mg/ml
	Trehalosa d/h	70,0 mg/ml
	Glicina	1,0 mg/ml
	Poloxamer 188	0,8 mg/ml
Pembro 25 mg/ml formul12	Pembrolizumab	25,0 mg/ml
	L-histidina	0,432 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,464 mg/ml
	Trehalosa d/h	90,0 mg/ml
	Glicina	2,0 mg/ml
	Poloxamer 188	0,8 mg/ml
Pembro 25 mg/ml formul13	Pembrolizumab	25,0 mg/ml
	L-histidina	0,432 mg/ml

	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,464 mg/ml
	Trehalosa d/h	70,0 mg/ml
	Glicina	2,0 mg/ml
	Poloxamer 188	1,2 mg/ml
Pembro 25 mg/ml formul14	Pembrolizumab	25,0 mg/ml
	L-histidina	0,432 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,464 mg/ml
	Trehalosa d/h	90,0 mg/ml
	Glicina	1,0 mg/ml
	Poloxamer 188	1,2 mg/ml
Pembro 50 mg/ml formul15	Pembrolizumab	50,0 mg/ml
	L-histidina	0,432 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,464 mg/ml
	Trehalosa d/h	90,0 mg/ml
	Glicina	1,0 mg/ml
	Poloxamer 188	0,8 mg/ml
Pembro 50 mg/ml formul16	Pembrolizumab	50,0 mg/ml
	L-histidina	0,432 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,464 mg/ml
	Trehalosa d/h	70,0 mg/ml
	Glicina	1,0 mg/ml
	Poloxamer 188	1,2 mg/ml
Pembro 50 mg/ml formul17	Pembrolizumab	50,0 mg/ml
	L-histidina	0,432 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,464 mg/ml
	Trehalosa d/h	90,0 mg/ml
	Glicina	2,0 mg/ml
	Poloxamer 188	1,2 mg/ml
Pembro 50 mg/ml formul18	Pembrolizumab	50,0 mg/ml
	L-histidina	0,432 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,464 mg/ml
	Trehalosa d/h	70,0 mg/ml
	Glicina	2,0 mg/ml
	Poloxamer 188	0,8 mg/ml

Pembro 25 mg/ml formul19	Pembrolizumab	25,0 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	Trehalosa d/h	80,0 mg/ml
	Glicina	1,5 mg/ml
	Poloxamer 188	1,0 mg/ml
Pembro 50 mg/ml formul20	Pembrolizumab	50,0 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	Trehalosa d/h	80,0 mg/ml
	Glicina	1,5 mg/ml
	Poloxamer 188	1,0 mg/ml

Envejecimiento acelerado.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas a una concentración de 25, 50 y 37,5 mg/ml se prepararon por diafiltración según la técnica 1 y se colocaron para su almacenamiento acelerado a una temperatura de 37 ± 2 °C según la técnica 8. Los resultados del estudio se muestran en el cuadro 31.

Tabla 31 - Resultados del estudio de estabilidad a una temperatura de 37 ± 2 °C

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	2 semanas	4 semanas	Cambio
1. Pembro 25 mg/ml formul1 pH5,1 90Tre+ 1Gly+0,8Koll	Concentración, mg/ml	24,30	n/a	24,30	n/a
	pH	5,23	n/a	5,23	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	311	n/a	302	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,39	0,45	0,78	0,39
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,59	99,46	99,16	-0,43
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,05	19,58	24,65	8,60
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	69,70	65,81	58,77	-10,93
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	14,25	14,61	16,58	2,33
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	7,78	21,86	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,74	97,52	97,87	0,13

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	2 semanas	4 semanas	Cambio
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	95,81	93,42	93,02	-2,79
	Actividad específica	115	n/a	109	-6
2. Pembro 25 mg/ml formul2 pH5,1 90Tre+ 2Gly+1,2Koll	Concentración, mg/ml	24,80	n/a	23,90	n/a
	pH	5,23	n/a	5,31	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	325	n/a	317	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,38	0,44	0,78	0,40
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,60	99,47	99,12	-0,48
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,08	19,59	24,85	8,77
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	69,76	66,08	59,24	-10,52
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	14,16	14,33	15,91	1,75
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	7,36	21,04	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,63	97,64	97,75	0,12
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,00	93,51	93,10	-2,90
	Actividad específica	109	n/a	112	3
3. Pembro 25 mg/ml formul3 pH5,1 70Tre+ 2Gly+0,8Koll	Concentración, mg/ml	24,70	n/a	24,60	n/a
	pH	5,35	n/a	5,35	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	247	n/a	246,00	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,39	0,46	0,73	0,34
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,59	99,46	99,20	-0,39
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,13	19,56	24,88	8,75
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,15	66,06	59,25	-10,90
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,73	14,38	15,87	2,14
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	8,18	21,80	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,67	97,78	97,8	0,13

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	2 semanas	4 semanas	Cambio
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	95,87	93,63	92,82	-3,05
	Actividad específica	100	n/a	104	4
4. Pembro 25 mg/ml formul4 pH5,1 70Tre+ 1Gly+1,2Koll	Concentración, mg/ml	25,10	n/a	24,30	n/a
	pH	5,23	n/a	5,19	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	226	n/a	233	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,40	0,45	0,77	0,37
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,58	99,49	99,14	-0,44
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,26	19,45	24,81	8,55
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,08	66,38	59,39	-10,69
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,66	14,18	15,80	2,14
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	7,41	21,37	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,57	97,48	97,81	0,24
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,29	93,37	93,13	-3,16
	Actividad específica	108	n/a	93	-15
5. Pembro 50 mg/ml formul5 pH5,1 90Tre+ 2Gly+0,8Koll	Concentración, mg/ml	49,90	n/a	48,90	n/a
	pH	5,30	n/a	5,22	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	329	n/a	347	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,43	0,54	0,94	0,51
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,55	99,40	98,95	-0,60
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,20	19,76	25,11	8,91
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,17	66,25	59,24	-10,93
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,63	13,99	15,64	2,01
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	7,83	21,84	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,64	97,53	97,54	-0,10
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,27	93,72	93,13	-3,14

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	2 semanas	4 semanas	Cambio
	Actividad específica	116	n/a	104	-12
6. Pembro 50 mg/ml formul6 pH5,1 70Tre+ 1Gly+0,8Koll	Concentración, mg/ml	49,90	n/a	48,60	n/a
	pH	5,29	n/a	5,35	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	246	n/a	237	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,44	0,64	0,96	0,52
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,53	99,31	98,96	-0,57
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,16	19,57	24,78	8,62
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	69,51	66,07	58,96	-10,55
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	14,32	14,36	16,26	1,94
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	6,89	21,11	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,47	97,51	97,79	0,32
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,36	93,59	92,94	-3,42
	Actividad específica	91	n/a	121	30
7. Pembro 50 mg/ml formul7 pH5,1 90Tre+ 1Gly+1,2Koll	Concentración, mg/ml	48,70	n/a	48,20	n/a
	pH	5,29	n/a	5,26	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	304	n/a	309	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,42	0,59	1,03	0,61
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,56	99,36	98,88	-0,68
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,24	19,74	25,16	8,92
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	69,95	66,92	58,90	-11,05
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,82	13,34	15,95	2,13
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	7,01	22,10	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,48	97,41	97,53	0,05
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,32	93,76	92,86	-3,46
	Actividad específica	91	n/a	92	1

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	2 semanas	4 semanas	Cambio
8. Pembro 50 mg/ml formul8 pH5,1 70Tre+ 2Gly+1,2Koll	Concentración, mg/ml	49,60	n/a	47,40	n/a
	pH	5,29	n/a	5,43	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	261	n/a	253	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,42	0,63	1,03	0,61
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,53	99,30	98,89	-0,64
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,44	19,73	25,46	9,02
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,67	66,47	59,57	-11,10
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	12,89	13,80	14,98	2,09
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	8,40	22,21	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,41	97,42	97,49	0,08
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,35	93,82	92,85	-3,50
	Actividad específica	111	n/a	90	-21
9. Pembro 37,5 mg/ml formul9 pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll	Concentración, mg/ml	38,80	n/a	38,10	n/a
	pH	5,63	n/a	5,60	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	285	n/a	276	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,45	0,56	0,97	0,52
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,53	99,38	98,95	-0,58
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,50	20,05	26,68	10,18
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	69,74	66,34	59,32	-10,42
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,76	13,61	14,01	0,25
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	7,10	20,84	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,70	97,39	97,65	-0,05
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,25	93,88	92,85	-3,40
	Actividad específica	100	n/a	86	-14
10. Pembro 37,5 mg/ml formul10	Concentración, mg/ml	38,00	n/a	37,10	n/a

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	2 semanas	4 semanas	Cambio
pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll	pH	5,67	n/a	5,59	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	288	n/a	276	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,45	0,61	0,96	0,51
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,53	99,34	98,98	-0,55
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,38	20,17	26,58	10,20
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,35	67,01	58,80	-11,55
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,27	12,82	14,62	1,35
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	7,59	23,11	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,62	97,58	97,61	-0,01
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,38	93,69	93,36	-3,02
	Actividad específica	114	n/a	83	-31
11. Pembro 25 mg/ml formul11 pH6,1 70Tre+ 1Gly+0,8Koll	Concentración, mg/ml	25,50	n/a	25,20	n/a
	pH	6,05	n/a	5,99	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	239	n/a	241	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,49	0,60	1,00	0,51
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,48	99,33	98,93	-0,55
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,30	21,95	28,93	12,63
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	68,83	66,24	56,92	-11,91
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	14,88	11,81	14,16	-0,72
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	11,31	25,26	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,62	97,4	97,52	-0,10
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,26	93,58	92,78	-3,48
	Actividad específica	108	n/a	95	-13
12. Pembro 25 mg/ml formul12 pH6,1 90Tre+ 2Gly+0,8Koll	Concentración, mg/ml	27,00	n/a	26,10	n/a
	pH	6,04	n/a	6,03	n/a

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	2 semanas	4 semanas	Cambio
	Osmolalidad, mOsm/kg	324	n/a	313	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,47	0,61	0,99	0,52
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,50	99,35	98,93	-0,57
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,45	22,00	29,67	13,22
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	69,37	65,53	56,93	-12,44
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	14,18	12,47	13,40	-0,78
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	11,10	26,43	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,42	97,19	97,32	-0,10
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,30	93,53	92,51	-3,79
	Actividad específica	141	n/a	91	-50
13. Pembro 25 mg/ml formul13 pH6,1 70Tre+ 2Gly+1,2Koll	Concentración, mg/ml	26,80	n/a	26,20	n/a
	pH	6,05	n/a	6,02	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	252	n/a	240	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,48	0,59	1,01	0,53
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,51	99,37	98,92	-0,59
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,70	21,71	29,45	12,75
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	69,76	65,74	57,52	-12,24
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,54	12,55	13,04	-0,50
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	10,03	25,50	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,55	97,41	97,3	-0,25
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,37	93,61	92,78	-3,59
	Actividad específica	93	n/a	125	32
14. Pembro 25 mg/ml formul14 pH6,1 90Tre+ 1Gly+1,2Koll	Concentración, mg/ml	27,00	n/a	26,10	n/a
	pH	6,02	n/a	6,06	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	304	n/a	288	n/a

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	2 semanas	4 semanas	Cambio
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,48	0,62	1,03	0,55
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,50	99,32	98,90	-0,60
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,54	21,77	29,19	12,65
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	69,68	65,89	57,49	-12,19
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,78	12,34	13,33	-0,45
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	10,45	25,30	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,71	97,08	97,54	-0,17
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,10	93,82	92,70	-3,40
	Actividad específica	108	n/a	117	9
15. Pembro 50 mg/ml formul15 pH6,1 90Tre+ 1Gly+0,8Koll	Concentración, mg/ml	50,80	n/a	52,20	n/a
	pH	6,09	n/a	6,22	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	325	n/a	319	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,59	0,79	1,38	0,79
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,39	99,16	98,55	-0,84
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,54	21,86	29,76	13,22
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,34	66,38	57,18	-13,16
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,12	11,76	13,06	-0,06
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	10,64	26,43	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,62	97,36	97,33	-0,29
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,33	96,50	92,83	-3,50
	Actividad específica	96	n/a	106	10
16. Pembro 50 mg/ml formul16 pH6,1 70Tre+ 1Gly+1,2Koll	Concentración, mg/ml	53,80	n/a	51,40	n/a
	pH	6,07	n/a	6,05	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	252	n/a	234	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,54	0,81	1,28	0,74

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	2 semanas	4 semanas	Cambio
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,43	99,15	98,65	-0,78
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,33	22,08	29,45	13,12
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	69,70	66,38	57,25	-12,45
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,97	11,55	13,30	-0,67
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	11,50	26,25	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,57	97,39	97,52	-0,05
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	95,15	96,30	92,92	-2,23
	Actividad específica	116	n/a	103	-13
17. Pembro 50 mg/ml formul17 pH6,1 90Tre+ 2Gly+1,2Koll	Concentración, mg/ml	52,90	n/a	52,50	n/a
	pH	6,10	n/a	6,08	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	336	n/a	326	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,58	0,75	1,35	0,77
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,34	99,20	98,58	-0,76
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,54	22,18	29,86	13,32
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,27	65,86	56,95	-13,32
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,19	11,97	13,19	0,00
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	11,27	26,64	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,66	97,33	97,33	-0,33
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,17	96,31	93,02	-3,15
	Actividad específica	91	n/a	106	15
18. Pembro 50 mg/ml fórmula 18 pH6,1 70Tre+ 2Gly+0,8Koll	Concentración, mg/ml	52,10	n/a	51,20	n/a
	pH	6,10	n/a	6,07	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	269	n/a	247	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,53	0,79	1,52	0,99
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,45	99,15	98,41	-1,04

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	2 semanas	4 semanas	Cambio
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,59	22,11	30,11	13,52
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,19	65,63	56,76	-13,43
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,22	12,26	13,13	-0,09
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	11,04	27,04	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,65	97,51	97,40	-0,25
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	94,04	96,32	93,03	-1,01
	Actividad específica	103	n/a	97	-6
19. Pembro 25 mg/ml formul19 pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll IC	Concentración, mg/ml	26,00	n/a	25,40	n/a
	pH	5,59	n/a	5,55	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	281	n/a	260	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,43	0,53	0,89	0,46
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,55	99,43	99,01	-0,54
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,08	19,88	26,16	10,08
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,71	66,90	58,73	-11,98
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,21	13,22	15,11	1,90
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	7,62	23,96	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,67	97,04	97,76	0,09
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	93,98	96,50	93,22	-0,76
	Actividad específica	100	n/a	104	4
20. Pembro 50 mg/ml formulación 20 pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll	Concentración, mg/ml	51,70	n/a	51,30	n/a
	pH	5,65	n/a	5,61	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	287	n/a	282	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,50	0,64	1,08	0,58
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,48	99,32	98,82	-0,66
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,57	20,04	26,43	9,86

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	2 semanas	4 semanas	Cambio
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,47	66,97	59,07	-11,40
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	12,97	13,00	14,51	1,54
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	7,00	22,80	n/a
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,71	97,07	97,55	-0,16
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	94,18	96,36	93,60	-0,58
	Actividad específica	97	n/a	92,00	-5

Todas las formulaciones de prueba mostraron un cambio aceptable en los parámetros de calidad (pureza determinada por SE HPLC, EC en condiciones reductoras y no reductoras, perfil de variantes cargadas y actividad específica), lo que fue confirmado por Design Space utilizando el software MODDE. Según los resultados del espacio experimental que reflejan el efecto de los factores (pH de la solución tampón y contenido de los componentes del excipiente) sobre las respuestas (parámetros de calidad), la composición farmacéutica es estable en el rango de concentraciones, pH y excipientes proporcionado bajo envejecimiento acelerado a 37 ± 2 °C durante 4 semanas.

Ejemplo 7. Determinación de la estabilidad bajo envejecimiento acelerado a largo plazo.

Para confirmar la estabilidad de la formulación seleccionada, se la sometió a un envejecimiento acelerado a una temperatura de 25 ± 2 °C.

Se prepararon composiciones farmacéuticas en el rango de concentración de proteínas (de 25 a 50 mg/ml), pH (de 5,1 a 6,1), concentración de dihidrato de trehalosa (de 70 a 90 mg/ml), concentración de glicina (de 1,0 a 2,0 mg/ml) y concentración de poloxamer 188 (de 0,8 a 1,2 mg/ml) por el método 1 y se almacenaron para la prueba de estabilidad a una temperatura de 25 ± 2 °C. Además, se seleccionaron, entre todas las composiciones, los casos más críticos, con el menor y el mayor contenido de excipientes y el máximo contenido de proteínas, así como las formulaciones cuyo contenido de excipientes se encontraba en el punto central del rango en cuestión.

Las formulaciones del ensayo se muestran en la Tabla 32.

Tabla 32 - Formulaciones del ensayo

Designación	Formulación

Pembro 50 mg/ml formul6	Pembrolizumab	50,0 mg/ml
	L-histidina	0,087 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,931 mg/ml
	Trehalosa d/h	70 mg/ml
	Glicina	1,0 mg/ml
	Poloxamer 188	0,8 mg/ml
Pembro 37,5 mg/ml formul9	Pembrolizumab	37,5 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	Trehalosa d/h	80,0 mg/ml
	Glicina	1,5 mg/ml
	Poloxamer 188	1,0 mg/ml
Pembro 37,5 mg/ml formul10	Pembrolizumab	37,5 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	Trehalosa d/h	80,0 mg/ml
	Glicina	1,5 mg/ml
	Poloxamer 188	1,0 mg/ml
Pembro 50 mg/ml formul17	Pembrolizumab	50,0 mg/ml
	L-histidina	0,432 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,464 mg/ml
	Trehalosa d/h	90,0 mg/ml
	Glicina	2,0 mg/ml
	Poloxamer 188	1,2 mg/ml
Pembro 25 mg/ml formul19	Pembrolizumab	25,0 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	Trehalosa d/h	80,0 mg/ml
	Glicina	1,5 mg/ml
	Poloxamer 188	1,0 mg/ml
Pembro 50 mg/ml formul20	Pembrolizumab	50,0 mg/ml
	L-histidina	0,221 mg/ml
	Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg/ml
	Trehalosa d/h	80,0 mg/ml

	Glicina	1,5 mg/ml
	Poloxamer 188	1,0 mg/ml

Envejecimiento acelerado.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas a una concentración de 25, 50 y 37,5 mg/ml se prepararon por diafiltración según la técnica 1 y se colocaron para su almacenamiento acelerado a una temperatura de 25 ± 2 °C según la técnica 8. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 33 y en las figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Tabla 33 - Resultados del estudio de estabilidad

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	1 mes	3 meses	4 meses	6 meses
6. Pembro 50 mg/ml formul6 pH5,1 70Tre+ 1Gly+0,8Koll	Concentración, mg/ml	49,90	n/a	49,59	49,53	50,00
	pH	5,29	n/a	5,38	n/a	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	246	n/a	261	n/a	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,44	0,592	0,60	0,592	0,59
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,53	99,36	99,36	99,36	99,33
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,16	17,28	21,17	22,69	26,63
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	69,51	66,89	63,35	63,87	59,40
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	14,32	15,83	15,48	13,44	13,97
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	5,24	12,32	13,06	20,93
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,47	97,76	97,47	97,58	96,95
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,36	93,52	96,95	96,041	96,48
	Actividad específica	91	n/a	96	n/a	110
9. Pembro 37,5 mg/ml formul9	Concentración, mg/ml	38,80	n/a	38,69	38,24	38,50
	pH	5,63	n/a	5,74	n/a	n/a

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	1 mes	3 meses	4 meses	6 meses
pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll	Osmolalidad, mOsm/kg	285	n/a	287,00	n/a	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,45	0,59	0,61	0,59	0,60
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,53	99,34	99,34	99,34	99,32
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,50	17,24	22,21	22,77	28,21
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	69,74	67,36	63,91	63,11	59,62
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,76	15,40	13,88	14,12	12,17
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	4,76	11,67	13,26	23,42
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,70	97,83	97,45	97,62	96,87
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,25	93,40	96,86	97,41	96,42
	Actividad específica	100	n/a	92	n/a	114
10. Pembro 37,5 mg/ml formul10	Concentración, mg/ml	38,00	n/a	35,37	38,05	38,00
	pH	5,67	n/a	5,68	n/a	n/a
pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll	Osmolalidad, mOsm/kg	288	n/a	280,00	n/a	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,45	0,625	0,61	0,625	0,61
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,53	99,15	99,35	99,15	99,32
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,38	17,54	22,17	23,76	28,19
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,35	67,36	64,24	64,12	59,51
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,27	15,10	13,59	12,12	12,30

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	1 mes	3 meses	4 meses	6 meses
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	5,99	12,23	14,77	23,62
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,62	97,82	97,43	97,57	97,08
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,38	93,64	96,92	97,85	96,18
	Actividad específica	114	n/a	87	n/a	93
17. Pembro 50 mg/ml formul17 pH6,1 90Tre+ 2Gly+1,2Koll	Concentración, mg/ml	52,90	n/a	52,36	52,69	52,00
	pH	6,10	n/a	6,16	n/a	n/a
	Osmolalidad, mOsm/kg	336	n/a	337,00	n/a	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,58	0,76	0,86	0,76	0,90
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,34	99,18	99,10	99,18	99,03
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,54	18,22	24,92	27,67	32,81
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,27	65,97	62,69	61,04	57,28
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,19	15,81	12,39	11,30	9,91
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	8,61	16,76	22,25	32,55
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,66	97,79	97,20	97,47	96,78
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	96,17	93,29	96,72	96,17	95,84
	Actividad específica	91	n/a	110	n/a	82
19. Pembro 25 mg/ml formul19	Concentración, mg/ml	26,00	n/a	26,00	25,76	25,65
	pH	5,59	n/a	5,60	n/a	n/a

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	1 mes	3 meses	4 meses	6 meses
pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll IC	Osmolalidad, mOsm/kg	281	n/a	290,00	n/a	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,43	0,53	0,53	0,53	0,50
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,55	99,41	99,44	99,41	99,42
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,08	17,30	22,15	23,85	28,08
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,71	67,01	64,15	64,31	59,79
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	13,21	15,69	13,70	11,85	12,13
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	7,40	13,13	15,53	24,00
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,67	97,62	97,36	97,31	96,98
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	93,98	93,28	96,86	96,56	96,25
	Actividad específica	100	n/a	125	n/a	117
20. Pembro 50 mg/ml formulación 20	Concentración, mg/ml	51,70	n/a	52,59	51,8	52,20
	pH	5,65	n/a	5,65	n/a	n/a
pH5,6 80Tre+ 1,5Gly+1,0Koll	Osmolalidad, mOsm/kg	287	n/a	304,00	n/a	n/a
	CONTENIDO DE AGREGADOS (SE HPLC), %.	0,50	0,692	0,69	0,692	0,71
	CONTENIDO DE MONÓMERO (SE HPLC), %.	99,48	99,25	99,26	99,25	99,22
	Fracciones ácidas (IE HPLC), %	16,57	17,32	22,11	24,24	28,31
	Fracciones básicas (IE HPLC), %	70,47	67,58	64,30	63,90	59,97

Información de la muestra	Indicador	Control inicial	1 mes	3 meses	4 meses	6 meses
	Fracciones alcalinas (IE HPLC), %	12,97	15,10	13,59	11,86	11,72
	Cambio absoluto en el perfil de la variante cargada	n/a	5,77	12,33	15,35	23,49
	Contenido de monómero, EC cond. red.	97,71	97,63	97,39	97,34	96,92
	Contenido de monómero, EC cond. no red.	94,18	92,83	96,78	96,03	96,19
	Actividad específica	97	n/a	109	n/a	99

Todas las composiciones farmacéuticas demostraron un nivel aceptable de cambios durante el almacenamiento acelerado.

Una composición farmacéutica que contenía una solución tampón de histidina en el rango de pH de 5,1 a 6,1, trehalosa dihidratada de 70 a 90 mg/ml, L-glicina de 1,0 a 2,0 mg/ml y poloxamer 188 de 0,8 a 1,2 mg/ml demostró un nivel aceptable de agregación (el aumento de agregados durante 6 meses a 25 ± 2 °C no fue superior al 0,32%), así como un pequeño cambio en el perfil ácido-base (cambio en el contenido de la fracción básica de no más del 13,0%) y un ligero cambio en la actividad específica bajo envejecimiento acelerado tanto a una concentración del anticuerpo monoclonal Pembrolizumab de 25 mg/ml como a una concentración mayor de hasta 50 mg/ml.

La adición de trehalosa dihidratada contribuyó a aumentar la temperatura de agregación y el punto de fusión del pembrolizumab. También observamos el menor cambio en los parámetros de calidad bajo estrés térmico, ligeros cambios en los parámetros de calidad tras la agitación y la congelación. Además, la glicina tiene un efecto positivo sobre la temperatura de agregación y el punto de fusión, así como sobre el parámetro de interacción de difusión. Se observó el efecto positivo de la glicina en los parámetros de calidad de las proteínas bajo hidrólisis ácida y básica. La adición de poloxamer 188 a la formulación contribuye a la estabilización de la proteína de prueba bajo agitación y congelación.

Según los resultados de las pruebas de estabilidad bajo estrés, la formulación desarrollada de excipientes de Pembrolizumab mostró ventajas significativas sobre la formulación de Keytruda bajo estrés térmico, hidrólisis ácida y básica; también, observamos una tendencia significativamente menor a la oxidación bajo fotoestrés, que tiene un efecto significativo en la estructura y la actividad específica de la proteína, y una mayor tendencia a la agregación.

Proporcionamos ejemplos de estudios que utilizan composiciones farmacéuticas acuosas de pembrolizumab. La composición farmacéutica acuosa utilizada para el estudio posterior se describe en la Tabla 34.

Tabla 34 - Composición farmacéutica acuosa de pembrolizumab.

Componente	En 1,0 ml	En vial
Pembrolizumab	25 mg	100 mg
L-histidina	0,221 mg	0,884 mg
Clorhidrato de L-histidina monohidratado	0,750 mg	3,0 mg
Trehalosa dihidratada	80 mg	320 mg
Glicina	1,5 mg	6,0 mg
Poloxamer 188	1,0 mg	4,0 mg
Agua para inyección	a 1 ml	a 4 ml

Los experimentos revelaron que la formulación del producto Keytruda presenta varios inconvenientes, a saber 1) insuficiente estabilidad coloidal del anticuerpo, 2) insuficiente estabilidad bajo estrés térmico, 3) baja estabilidad del perfil de la variante cargada bajo estrés mecánico y congelación.

En el marco de la presente invención, se han producido composiciones farmacéuticas que tienen suficiente estabilidad coloidal y térmica, así como una alta estabilidad del perfil de variantes cargadas bajo tensión mecánica y congelación. Además, las composiciones farmacéuticas que contienen trehalosa y poloxamer 188 en sus formulaciones (por ejemplo, la formulación indicada en la Tabla 34) se caracterizan además por una baja tendencia a formar impurezas de alto peso molecular bajo almacenamiento a largo plazo, así como una baja tendencia a la oxidación, pérdida de actividad específica y aumento de impurezas bajo fotoestrés y almacenamiento a largo plazo.

Los datos resultantes relacionados con la estabilidad de las composiciones farmacéuticas indican la compatibilidad de los excipientes entre sí y con el principio activo.

Reivindicaciones

1. Una composición farmacéutica de pembrolizumab que comprende:

(i) pembrolizumab;

(ii) histidina

(iii) clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) glicina;

(v) trehalosa y poloxamer 188,
o prolina; y

(vi) agua para inyección.

2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el pembrolizumab está presente en una concentración de 5-50 mg/ml.

3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la histidina está presente en una concentración de 0,087-0,432 mg/ml.

4. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,464-0,931 mg/ml.

5. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la glicina está presente en una concentración de 1-2 mg/ml.

6. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la trehalosa está presente en una concentración de 70-130 mg/ml.

7. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el poloxamer 188 está presente en una concentración de 0,8-1,2 mg/ml.

8. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la prolina está presente en una concentración de 20-34 mg/ml.

9. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, que comprende:

(i) 5-50 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,087-0,432 mg/ml de histidina;

(iii) 0,464-0,931 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1-2 mg/ml de glicina;

(v) 70-130 mg/ml de trehalosa y 0,8-1,2 mg/ml de poloxamer 188, o 20-34 mg/ml de prolina; y

(vi) agua para inyección a 1 ml.

10. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que el pembrolizumab está presente a una concentración de 20-30 mg/ml.

11. La composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la que el pembrolizumab está presente en una concentración de 25 mg/ml.

12. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que la histidina está presente en una concentración de 0,200-0,319 mg/ml.

13. La composición farmacéutica según la reivindicación 12, en la que la histidina está presente en una concentración de 0,221 mg/ml.

14. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,650-0,850 mg/ml.

15. La composición farmacéutica según la reivindicación 14, en la que el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,750 mg/ml.

16. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que la glicina está presente en una concentración de 1,5 mg/ml.

17. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que la trehalosa está presente en una concentración de 70-100 mg/ml.

18. La composición farmacéutica según la reivindicación 17, en la que la trehalosa está presente en una concentración de 75-85 mg/ml.

19. La composición farmacéutica según la reivindicación 18, en la que la trehalosa está presente a una concentración de 80 mg/ml.

20. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la trehalosa es trehalosa dihidratada.

21. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que el poloxamer 188 está presente en una concentración de 1,0 mg/ml.

22. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que la prolina está presente en una concentración de 24-30 mg/ml.

23. La composición farmacéutica según la reivindicación 22, en la que la prolina está presente en una concentración de 27 mg/ml.

24. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la composición tiene un pH de 5,1 a 6,1.

25. La composición farmacéutica según la reivindicación 24, en la que la composición tiene un pH de 5,6.

26. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, que comprende:

(vii) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(viii) 0,221 mg/ml de histidina;

(ix) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(x) 1,5 mg/ml de glicina;

(xi) 80 mg/ml de trehalosa y 1,0 mg/ml de poloxamer 188;

(xii) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH 5,5 - 5,7.

27. La composición farmacéutica según la reivindicación 20, que comprende:

(i) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(ii) 0,221 mg/ml de histidina;

(iii) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(iv) 1,5 mg/ml de glicina;

(v) 80 mg/ml de trehalosa dihidratada y 1,0 mg/ml de poloxamer 188;

(vi) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7.

28. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, que comprende:

(vii) 25 mg/ml de pembrolizumab;

(viii) 0,221 mg/ml de histidina;

(ix) 0,750 mg/ml de clorhidrato de histidina monohidratado;

(x) 1,5 mg/ml de glicina;

(xi) 27 mg/ml de prolina;

(xii) agua para inyección a 1 ml; y

donde la composición tiene un pH de 5,5 a 5,7.

29. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 26-28, en la que la composición tiene un pH de 5,6.

30. Una composición farmacéutica de pembrolizumab producida por liofilización de la composición farmacéutica de pembrolizumab según cualquiera de las reivindicaciones 1-29.

31. Uso de la composición farmacéutica de pembrolizumab según cualquiera de las reivindicaciones 1-30 para tratar una neoplasia maligna o una enfermedad infecciosa.

32. El uso según la reivindicación 31, donde la neoplasia maligna se selecciona del grupo: melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, linfoma mediastínico primario de células B grandes, cáncer urotelial, cáncer de estómago, neoplasias malignas con alta inestabilidad de microsatélites/deficiencia de reparación de emparejamientos de ADN (MMR), neoplasmas malignos, cáncer hepatocelular, cáncer de cuello uterino, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de células renales, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de piel de células escamosas, carcinoma de células basales, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de vesícula biliar, tumor cerebral maligno, glioblastoma, tumor con alta carga mutacional.

33. Uso de la composición farmacéutica de pembrolizumab según cualquiera de las reivindicaciones 1-30 para producir un medicamento destinado a tratar una neoplasia maligna o una enfermedad infecciosa.

34. El uso según la reivindicación 33, donde la neoplasia maligna se selecciona del grupo: melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer

de pulmón de células pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, linfoma mediastínico primario de células B grandes, cáncer urotelial, cáncer de estómago, neoplasias malignas con alta inestabilidad de microsatélites/deficiencia de reparación de emparejamientos de ADN (MMR), neoplasmas malignos, cáncer hepatocelular, cáncer de cuello uterino, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de células renales, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de piel de células escamosas, carcinoma de células basales, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de vesícula biliar, tumor cerebral maligno, glioblastoma, tumor con alta carga mutacional.

Resumen

La invención se refiere al campo de la farmacia y la medicina, específicamente a las composiciones farmacéuticas del anticuerpo anti-PD-1 pembrolizumab, que pueden ser composiciones acuosas o liofilizadas. La invención se refiere además al uso de dichas composiciones para el tratamiento de neoplasias malignas o enfermedades infecciosas, así como al uso de dichas composiciones para producir un medicamento destinado a tratar neoplasias malignas o enfermedades infecciosas.