(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 988 481**

(51) Int. CI.:

A61K 9/19 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 38/09 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2013 PCT/EP2013/061264**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13178788**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2013 E 13726219 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2024 EP 2854831**

(54) Título: **Fabricación de degarelix**

(30) Prioridad:

01.06.2012 EP 12170454

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2024

(73) Titular/es:

FERRING B.V. (100.0%)
Polaris Avenue 144
2132 JX Hoofddorp, NL

(72) Inventor/es:

SCHWACH, GRÉGOIRE;
NILSSON, ANDERS;
GOTTSCHALK BOEVING, TINE ELISABETH;
RASMUSSEN, JON HOLBECH;
MÖRNSTAM, BIRGITTA;
TSIRK, ANDERS;
ANNBY, ULF y
FOMSGAARD, JENS

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Fabricación de degarelix

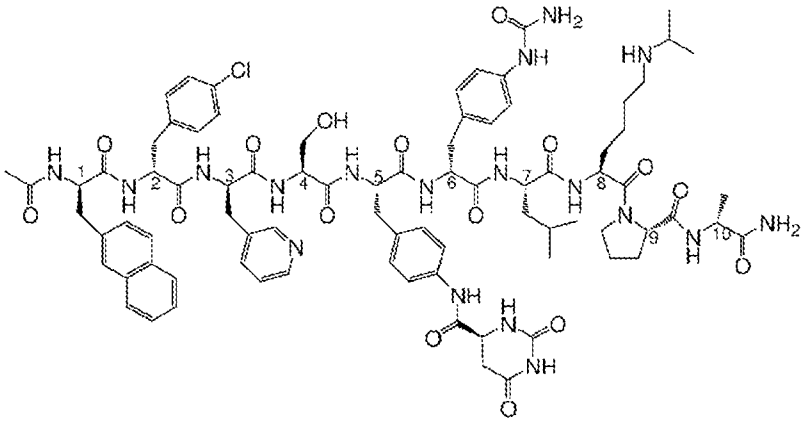
Campo técnico

La presente invención se refiere a un proceso de fabricación para preparar degarelix.

Antecedentes de la invención

El cáncer de próstata es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en varones en el mundo industrializado. El degarelix, también conocido como FE200486, es un antagonista del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina de tercera generación (GnRH) (un bloqueador de GnRH) que se ha desarrollado y aprobado para pacientes con cáncer de próstata que necesitan terapia de ablación de andrógenos (Doehn et al., Drugs 2006, vol. 9, Nº 8, páginas 565-571; documento WO 09846634). El degarelix actúa mediante el bloqueo inmediato y competitivo de los receptores de GnRH en la hipófisis y, al igual que otros antagonistas de GnRH, no causa una estimulación inicial de la producción de hormona luteinizante a través del eje hipotalámico-hipófisis-gonadal, y por lo tanto no provoca un aumento de testosterona o un brote clínico (Van Poppel, Cancer Management and Research, 2010:2 39-52; Van Poppel et al., Urology, 2008, 71(6), 1001-1006); James, E.F. et al., Drugs, 2009, 69(14), 1967-1976).

El degarelix es un decapéptido lineal sintético que contiene siete aminoácidos no naturales, cinco de los cuales son D-aminoácidos. Posee diez centros quirales en el esqueleto de decapéptido. El residuo de aminoácido presente en la posición 5 en la secuencia posee un centro quiral adicional en la sustitución de la cadena lateral, lo que da lugar a once centros quirales en total. Su número de registro CAS es 214766-78-6 (de base libre) y está disponible comercialmente con la denominación comercial Firmagon™. La sustancia farmacológica se denomina químicamente D-alaninamida, N-acetil-3- (2-naftalenil)-D-alanil-4-cloro-D-fenilalanil-3-(3-piridinil)-D-alanil-L-seril-4-[[[(4S)-hexahidro-2, 6-dioxo-4-pirimidinil]carbonil]amino]-L-fenilalanil-4-[(aminocarbonil) amino]-D-fenilalanil-L-leucil-N6-(1-metiletil)-L-lisil-L-prolil- y se representa por la estructura química siguiente (en lo sucesivo también denominada Fórmula I):



La estructura de degarelix también puede representarse como:

Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-Ser-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(Cbm)-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH_2

en la que Ac es acetilo, 2Nal es 2-naftilalanina, 4Cpa es 4-clorofenilalanina, 3Pal es 3-piridilalanina, Ser es serina, 4Aph es 4-aminofenilalanina, Hor es hidroorotilo, Cbm es carbamoilo, Leu es leucina, Lys(iPr) es N6-isopropillisina, Pro es prolina y Ala es alanina.

Para fines de descripción de la presente invención, a cada aminoácido presente en el degarelix se le proporcionará la notación abreviada siguiente:

AA_1 es D-2Nal, AA_2 es D-4Cpa, AA_3 es D-3Pal, AA_4 es Ser, AA_5 es 4Aph(L-Hor), AA_6 es D-Aph(Cbm), AA_7 es Leu, AA_8 es Lys(iPr), AA_9 es Pro y AA_{10} es D-Ala.

Así, el degarelix se puede representar como Ac-AA_1-AA_{10}-NH_2.

El degarelix se ha preparado previamente usando metodología de síntesis peptídica en fase sólida con Boc (SPPS) tal como se informa en el documento WO 98/46634 y Jiang et al., J. Med. Chem. 2001, 44, 453-467.

Los documentos WO2010/12835 y WO2011/066386 describen la preparación de degarelix utilizando una estrategia Fmoc. Los documentos WO2012/055905 y WO2012/055903 describen la síntesis en fase líquida de degarelix. El

documento WO2011/004260 describe composiciones farmacéuticas para reconstitución que comprenden acetato de degarelix liofilizado.

Sumario de la invención

La caracterización fisicoquímica del degarelix ha demostrado que este decapéptido tiene la capacidad de autoasociarse y que, eventualmente, forma geles en solución acuosa. La autoagregación hace que este compuesto constituya un depósito *in situ* cuando se inyecta por vía subcutánea o intramuscular. Se ha demostrado que el depósito de degarelix proporcionaba una liberación mantenida del principio activo durante meses dependiendo de la dosificación. Actualmente el fármaco se administra en dosis de 120 mg (40 mg/ml) para la primera inyección, y de 80 mg (20 mg/ml) para la liberación mantenida durante un mes.

Los presentes inventores han descubierto, sorprendentemente, que la viscosidad, y por lo tanto las propiedades de liberación mantenida y la biodisponibilidad, del producto farmacológico reconstituido pueden controlarse por medio del procesamiento del péptido bruto (por ejemplo, obtenido mediante la estrategia Fmoc, síntesis en fase líquida u otra vía) en la sustancia farmacológica. La viscosidad asociada con la sustancia farmacológica se correlaciona sorprendentemente con la viscosidad asociada con el producto farmacológico, incluso después de una reconstitución y liofilización adicionales. La viscosidad del producto farmacológico tiene que controlarse dentro de un intervalo de hasta 15 mPas, preferentemente dentro de un intervalo de 2 a 12 mPas, para obtener la formación de depósito deseada y, por tanto, la liberación mantenida. La presente invención proporciona procesos que permiten la fabricación de productos farmacológicos que muestran esta viscosidad, determinada tras su reconstitución con el fluido de reconstitución a una concentración de 20 mg de degarelix por ml de fluido de reconstitución.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una sustancia farmacológica de degarelix liofilizada que consiste en degarelix, del 4,5 al 10,0% de ácido acético (p/p), una cantidad residual de agua e impurezas debidas al proceso de producción, si las hubiera, que muestra, tras su disolución en agua en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix/ml de agua que contiene el 2,5% en peso de manitol, una viscosidad de hasta 3,2 mPas, en la que la viscosidad se mide usando un viscosímetro rotatorio equipado con un sistema de medición de cono-placa con D = 60 mm y 1°, incrementándose la velocidad de cizallamiento de 0 a 500 s^{-1} en 20 etapas, utilizando un programa de etapas de rotación a velocidad controlada a una temperatura constante de 20+ -0,2 ºC.

Opcionalmente, la sustancia farmacológica de degarelix liofilizada muestra, tras su disolución en agua en una cantidad de 20 mg de base libre degarelix/ml de agua que contiene el 2,5% en peso de manitol, una viscosidad de 1,15 a 2,0 mPas, en la que la viscosidad se mide usando un viscosímetro rotatorio equipado con un sistema de medición de cono-placa con D = 60 mm y 1°, incrementándose la velocidad de cizallamiento de 0 a 500 s^{-1} en 20 etapas, utilizando un programa de etapas de rotación a velocidad controlada a una temperatura constante de 20+ -0,2 ºC.

De acuerdo con la presente invención, también se proporciona un procedimiento para producir la sustancia farmacológica de degarelix según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas siguientes:

a. Purificar degarelix tal como se obtiene mediante síntesis peptídica en fase líquida o sólida para obtener una solución de degarelix con una pureza de al menos el 95%;

b. Evaporar el disolvente para concentrar la solución de degarelix para obtener degarelix agregado;

c. Desagregar el degarelix agregado con ácido acético; y

d. Liofilizar el degarelix desagregado para proporcionar la sustancia farmacológica de degarelix.

De acuerdo con la presente invención, también se proporciona un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

a. Purificar degarelix tal como se obtiene mediante síntesis peptídica en fase líquida o sólida para obtener una solución de degarelix con una pureza de al menos el 95%;

b. Cargar la solución de degarelix en una columna cromatográfica;

c. Eluir el degarelix de la columna con ácido acético para proporcionar degarelix eluido;

d. Liofilizar el degarelix eluido para proporcionar la sustancia farmacológica de degarelix.

De acuerdo con la presente invención, también se proporciona un procedimiento para producir la sustancia farmacológica de degarelix según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas siguientes:

a. Purificar degarelix tal como se obtiene mediante síntesis peptídica en fase líquida o sólida para obtener una solución de degarelix con una pureza de al menos el 95%;

b. Ajustar la concentración de ácido acético de la solución de degarelix purificada a del 6 al 40% (p/p), si es necesario;

c. Secar por pulverización la solución de degarelix para proporcionar la sustancia farmacológica de degarelix.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para controlar que la viscosidad de un producto de degarelix no sea superior a 15 mPas, preferentemente que se encuentre dentro de un intervalo de 2 a 12 mPas, determinada tras su reconstitución con agua para inyección en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix/ml, que comprende las etapas siguientes:

1. Proporcionar una sustancia farmacológica de degarelix liofilizada que muestra una viscosidad de hasta 3,2 mPas, determinada tras su disolución en agua que contiene manitol (2,5% p/v) en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix/ml

2. Disolver la sustancia farmacológica de degarelix liofilizada en agua que contiene manitol para proporcionar una mezcla acuosa de degarelix-manitol;

3. Liofilizar la mezcla acuosa de degarelix-manitol para proporcionar el producto farmacológico de degarelix.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para producir un producto de degarelix liofilizado que muestra una viscosidad de hasta 15 mPas, preferentemente dentro de un intervalo de 2 a 12 mPas, determinada tras su reconstitución con agua para inyección en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix/ml, que comprende las etapas siguientes:

1. Proporcionar una sustancia farmacológica de degarelix liofilizada que muestra una viscosidad de hasta 3,2 mPas, determinada tras su disolución en agua que contiene manitol (2,5% p/v) en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix/ml

2. Disolver la sustancia farmacológica de degarelix liofilizada en agua que contiene manitol para proporcionar una mezcla acuosa de degarelix-manitol; y

3. Liofilizar la mezcla acuosa de degarelix-manitol para proporcionar el producto farmacológico de degarelix.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para producir un producto farmacológico de degarelix que comprende un producto farmacológico de degarelix liofilizado y un líquido para reconstitución (fluido de reconstitución) que, tras su reconstitución con dicho líquido en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix/ml, muestra una viscosidad de hasta 15 mPas, preferentemente dentro de un intervalo de 2 a 12 mPas, que comprende las etapas siguientes:

1. Disolver una sustancia farmacológica de degarelix liofilizada en una solución acuosa que contiene manitol para proporcionar una mezcla de degarelix-manitol;

2. Liofilizar la mezcla de degarelix-manitol para proporcionar el producto farmacológico de degarelix,

en el que se añade un agente reductor de la viscosidad a la mezcla de degarelix-manitol antes de la liofilización.

La presente invención proporciona una sustancia farmacológica de degarelix liofilizada que muestra, tras su disolución en agua que contiene manitol al 2,5% en peso en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix/ml, una viscosidad de hasta 3,2 mPas, y procesos para proporcionar esta sustancia farmacológica de degarelix liofilizada.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un producto farmacológico de degarelix que comprende un producto farmacológico de degarelix liofilizado y un fluido de reconstitución que, tras su reconstitución con dicho fluido de reconstitución en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix/ml, muestra una viscosidad de hasta 15 mPas, preferentemente dentro de un intervalo de 2 a 12 mPas, y contiene un agente reductor de la viscosidad en una cantidad de 0,001 a 5 mg/ml.

Figuras

La figura 1 muestra la relación entre la viscosidad de la sustancia farmacológica y la viscosidad del producto farmacológico.

Las figuras 2 y 3 muestran la relación entre la viscosidad dinámica de la suspensión de dosificación de degarelix (20 mg/ml) y las concentraciones plasmáticas de degarelix (rata) el día 3 (figura 2) y el día 28 (figura 3).

Descripción detallada de la invención

Los procedimientos para producir un producto de degarelix liofilizado comienzan con la sustancia farmacológica de degarelix que se describirá con más detalle.

La sustancia farmacológica de degarelix

El decapéptido degarelix puede prepararse mediante síntesis peptídica en fase sólida, tal como se divulga en los documentos WO98/46634, WO2010/12835 y WO2011/066386, o mediante síntesis peptídica en fase líquida, tal como se divulga en los documentos WO2012/055905 o WO2012/055903. Esta síntesis peptídica proporciona degarelix bruto que se purifica adicionalmente y después se liofiliza para proporcionar un producto liofilizado que consiste en degarelix, ácido acético, una cantidad residual de agua y cantidades secundarias de impurezas debidas al proceso de producción, si las hubiera. Este producto se denomina sustancia farmacológica de degarelix o simplemente sustancia farmacológica en la presente invención. La sustancia farmacológica de degarelix consiste preferentemente en degarelix, del 4,5 al 10% en peso (p/p) de ácido acético y hasta el 10% en peso de agua (p/p).

La fabricación de la sustancia farmacológica puede dividirse en una primera etapa (A) que proporciona degarelix purificado en solución, y una segunda etapa (B) que proporciona la sustancia farmacológica de degarelix.

Etapa (A): Purificación

La etapa (A) comprende la purificación de degarelix bruto en una o más etapas, preferentemente en dos etapas, seguida opcionalmente de una etapa de concentración en columna y/o intercambio de sal.

El degarelix bruto, obtenido por LPPS o SPPS, se somete en primer lugar a una purificación. La purificación se lleva a cabo preferentemente aplicando la solución peptídica obtenida por SPPS o LPPS a una columna con material de fase inversa, que preferentemente se equilibra previamente con un tampón. Esta primera etapa de purificación proporciona preferentemente una pureza de al menos el 95%, determinada por HPLC.

Preferentemente, la cromatografía en columna de fase inversa se repite para obtener un producto con una pureza de al menos el 97,5%, determinada por HPLC.

De forma más preferida, la solución de degarelix purificada con una pureza de al menos el 95%, preferentemente al menos el 97,5%, se somete a una etapa de cromatografía en columna adicional para preconcentrar la solución de degarelix y/o para el intercambio de sal (particularmente si se usa ácido acético para el ajuste del pH de los eluyentes en la última etapa de purificación).

Esta etapa de preconcentración y/o intercambio de sal también se lleva a cabo preferentemente en una columna de fase inversa: La solución de degarelix purificada se diluye con agua (preferentemente de 1,5 a 2,5 veces) y se aplica a la columna, preequilibrada con tampón. La columna se lava en primer lugar preferentemente con etanol (concentración baja, generalmente inferior al 20%) y acetato de amonio acuoso y posteriormente con etanol (concentración baja, generalmente inferior al 20%)/ácido acético/agua. Después, la columna se eluye, por ejemplo con etanol (concentración alta, generalmente del 20 al 60%)/ácido acético/agua para obtener una solución más concentrada de degarelix en comparación con las soluciones obtenidas después de la(s) etapa(s) de purificación. El proceso no está limitado a etanol como modificador orgánico en el eluyente. También se pueden usar otros disolventes tales como acetonitrilo.

La etapa (A) proporciona degarelix purificado en solución.

Etapa (B)

El tratamiento posterior del degarelix purificado en solución para obtener la sustancia farmacológica de degarelix se puede llevar a cabo de diferentes maneras. A continuación, se ilustran cuatro formas preferidas (etapas (B1), (B2), (B3) y (B4)).

Etapa (B1): Concentración - desagregación - liofilización

El degarelix purificado en solución se somete en primer lugar a una etapa de concentración en la que se elimina el etanol u otro modificador orgánico tal como acetonitrilo por evaporación. Esta etapa se lleva a cabo preferentemente con un evaporador rotatorio. La temperatura máxima preferida durante la evaporación es de 40 ºC. El producto de degarelix viscoso, altamente concentrado, resultante (producto agregado que se encuentra normalmente en forma de gel) se trata después con ácido acético (etapa de desagregación), preferentemente se filtra y se liofiliza.

La etapa de desagregación es importante para controlar la viscosidad de la sustancia farmacológica. Por lo tanto, la etapa de desagregación se lleva a cabo preferentemente con una o más, de la forma más preferida con la totalidad, de las siguientes condiciones:

- Concentración final de ácido acético: 6-40%, preferentemente 15-35% (v/v)
- Temperatura de 0 a 35 ºC, preferentemente de 2 a 30 ºC, de la forma más preferida de 5 a 15 ºC
- Concentración de degarelix (base libre) 5-35 g/l, preferentemente 10-20 g/l
- Tiempo 1-15 horas

Dentro de estos límites, pueden encontrarse combinaciones adecuadas de parámetros de proceso mediante una experimentación sencilla.

La etapa de liofilización se lleva a cabo preferentemente a un espesor de hielo de 1,2 a 2,4 cm y un tiempo de secado secundario de 1 a 17 horas. La temperatura de secado secundario es normalmente de aproximadamente 20 ºC (15 a 25 ºC).

Preferentemente, la etapa (B1) proporciona así una sustancia farmacológica liofilizada que muestra una viscosidad inferior a 3,2 mPas, preferentemente de entre 1,15 y 2 mPas (determinada tras su disolución en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix en 1 ml de agua que contiene manitol al 2,5% (p/v)). El procedimiento para medir la viscosidad se describe en la sección experimental. Una sustancia farmacológica que cumple este requisito de viscosidad se denomina también sustancia farmacológica (1), mientras que una sustancia farmacológica que no cumple este requisito de viscosidad se denomina también sustancia farmacológica (2). La sustancia farmacológica (2) presenta una viscosidad preferida de 3,2 a 15 mPas, tras su disolución en una cantidad de 20 mg en 1 ml de agua. La sustancia farmacológica (2) puede ser incluso similar a un gel, en una condición significativamente superior a 3,2 mPas, incluso aunque su viscosidad no pueda medirse con precisión.

A este respecto, se observa que "tras su disolución en una cantidad de 20 mg en 1 ml de agua" se refiere simplemente a las condiciones para medir la viscosidad y no significa que la sustancia farmacológica esté presente en una solución de 20 mg/ml. De la forma más preferida, la sustancia farmacológica está presente en forma liofilizada.

La sustancia farmacológica, en particular la sustancia farmacológica (1), se caracteriza además preferentemente por un contenido de ácido acético del 4,5 al 10,0% (p/p) y/o un contenido de agua del 10% o inferior (p/p). Además, la sustancia farmacológica, en particular la sustancia farmacológica (1), muestra preferentemente una densidad óptica de 0,10 UA o inferior (a una concentración de 20 mg de base libre de degarelix/ml en manitol (ac) al 2,5%). El procedimiento para medir la densidad óptica se describe en la sección experimental.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir la sustancia farmacológica de degarelix (1), que comprende las etapas siguientes:

a. Purificar degarelix tal como se obtiene mediante síntesis peptídica en fase líquida o sólida para obtener una solución de degarelix con una pureza de al menos el 95%;

b. Evaporar el disolvente para concentrar la solución de degarelix para obtener degarelix agregado;

c. Desagregar el degarelix agregado con ácido acético; y

d. Liofilizar el degarelix desagregado para proporcionar la sustancia farmacológica de degarelix.

La divulgación proporciona además un procedimiento para modular la viscosidad de degarelix, de forma que después de su liofilización y su reconstitución con agua, la viscosidad de una solución de degarelix de 20 mg/ml en manitol al 2,5% p/v no sea superior a 15 mPas, que comprende:

tratar degarelix agregado con ácido acético; y

liofilizar la mezcla de degarelix y ácido acético.

Preferentemente, las condiciones para la adición de ácido acético y la liofilización son tal como se han descrito anteriormente. En formas de realización particulares, el contenido de ácido acético después de la liofilización es del 4,5 al 10,0% (p/p).

<u>Etapa (B2):</u> Concentración en columna - liofilización

La solución de degarelix obtenida en la etapa A (preferentemente después de un procedimiento de purificación de una o dos etapas, por ejemplo sin preconcentración/intercambio de sal) se carga en una columna cromatográfica, se realiza un intercambio iónico y la columna se enjuaga (se lava) con ácido acético diluido (aproximadamente al 1%). El degarelix se eluye de la columna utilizando ácido acético acuoso a una concentración de AcOH del 20 al 50% en peso, preferentemente del 23 al 37% en peso, preferentemente del 23 al 27% en peso, preferentemente del 27 al 37% en

peso, preferentemente del 33 al 37% en peso, preferentemente del 35% en peso, y posteriormente se diluye opcionalmente a la concentración de AcOH apropiada y se filtra. A continuación, se liofiliza la solución en AcOH/agua de degarelix. La fase estacionaria en la columna puede ser de diferentes tipos. La fase estacionaria puede contener grupos funcionales tales como hidrocarburos (alifáticos y aromáticos), alcoholes, nitrilos, grupos con propiedades ácidas/básicas apropiadas y grupos de intercambio iónico, pero no se limita a este tipo de grupos. Este proceso proporciona la sustancia farmacológica, preferentemente la sustancia farmacológica (1).

Así, la invención proporciona un procedimiento para producir la sustancia farmacológica de degarelix, que comprende las etapas siguientes:

a. Purificar degarelix tal como se obtiene mediante síntesis peptídica en fase líquida o sólida para obtener una solución de degarelix con una pureza de al menos el 95%;

b. Cargar la solución de degarelix en una columna cromatográfica;

c. Eluir el degarelix de la columna con ácido acético para proporcionar degarelix eluido;

d. Liofilizar el degarelix eluido para proporcionar la sustancia farmacológica de degarelix.

Etapa (B3): Aislamiento mediante liofilización-reconstitución en AcOH/agua-liofilización

Se aísla degarelix purificado en solución obtenido después de la etapa A por medio de liofilización; el producto liofilizado resultante se disuelve a una concentración de entre 10 y 20 g/l en ácido acético al 2%, y se liofiliza de nuevo para dar la sustancia farmacológica de degarelix (1).

Etapa (B4): Secado por pulverización

Se aísla degarelix purificado en solución (EtOH/agua que contiene AcOH o ACN/agua que contiene AcOH obtenida después de la etapa A, o tal como se describe en la etapa B1 excepto por la liofilización, o B2 excepto por la liofilización) por medio de secado por pulverización para proporcionar la sustancia farmacológica de degarelix (1).

Preferentemente, una solución de degarelix purificado tal como se obtiene en la etapa A se somete directamente al proceso de secado por pulverización. La concentración de AcOH de dicha solución acuosa de degarelix sometida a secado por pulverización se ajusta a del 6 al 40% (v/v), preferentemente del 15 al 35% (v/v).

Después de haber descrito la fabricación de la sustancia farmacológica, se describirá ahora la fabricación del producto farmacológico de degarelix. El producto farmacológico de degarelix liofilizado comprende la sustancia farmacológica de degarelix y manitol, es decir, comprende (y preferentemente consiste en) degarelix, ácido acético, manitol, una cantidad residual de agua y cantidades secundarias de impurezas debidas al proceso de producción, si las hubiera.

Proceso de producción A del producto farmacológico de degarelix

El proceso de producción A es el aspecto de la divulgación mencionada anteriormente, es decir, un procedimiento para producir un producto farmacológico de degarelix que, tras su reconstitución con agua para inyección en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix/ml, muestra una viscosidad de hasta 15 mPas, preferentemente dentro de un intervalo de 2 a 12 mPas, que comprende las etapas siguientes:

a. Proporcionar una sustancia farmacológica de degarelix liofilizada, preferentemente una sustancia farmacológica de degarelix (1);

b. Disolver la sustancia farmacológica de degarelix liofilizada en agua que contiene manitol para proporcionar una mezcla acuosa de degarelix-manitol;

c. Liofilizar la mezcla acuosa de degarelix-manitol para proporcionar el producto farmacológico de degarelix.

En la presente divulgación, "tras su reconstitución con agua para inyección en una cantidad de 20 mg/ml" se refiere a las condiciones para medir la viscosidad y no significa que el producto farmacológico esté presente en una solución de 20 mg/ml. De la forma más preferida, el producto farmacológico está presente en forma liofilizada, opcionalmente en combinación con líquido de reconstitución. Las cantidades preferidas por vial se encuentran en el intervalo de 60 a 300 mg (tal como 120 mg, 80 mg y 240 mg). Alternativamente, puede proporcionarse como producto farmacológico reconstituido, con concentraciones preferidas en el intervalo de 2 a 100 mg/ml, preferentemente de 10 a 70 mg/ml (tal como 40 mg/ml, 20 mg/ml y 60 mg/ml).

La etapa b también puede denominarse etapa de combinación. Preferentemente, la filtración y el llenado de viales se llevan a cabo después de la combinación y antes del secado por congelación de tal manera que todo el proceso de producción A preferido comprende las etapas siguientes:

- Combinación para proporcionar el producto farmacológico a granel sin filtrar
- Filtración (estéril)
- Llenado de viales
- Secado por congelación/liofilización

Combinación para proporcionar el producto farmacológico a granel

La sustancia farmacológica se somete a una etapa de combinación, que generalmente se lleva a cabo de la forma siguiente:

Para la producción del producto farmacológico a granel sin filtrar, la sustancia farmacológica y el manitol se disuelven en agua (agua pura; generalmente agua Milli-Q) cada uno en cantidades de 10-60 g, por 1000 g de tamaño de lote. Las cantidades típicas son de 20 a 50 g de sustancia farmacológica (como contenido de base libre de degarelix determinado por HPLC) y de 10 a 50 g de manitol por 1000 g. La cantidad real depende de la concentración final de degarelix en el producto farmacológico y el volumen del líquido de reconstitución (el manitol se añade preferentemente de forma que se obtenga una solución isotónica con una osmolalidad de 300 mOsm +/-30 mOsm después de la reconstitución).

Para la producción, se añade agua (normalmente aproximadamente el 80% de la cantidad total de agua) a un recipiente de combinación. Se añade el manitol y se disuelve mediante agitación. A continuación, se añade la sustancia farmacológica a la solución de manitol agitada y el material a granel formulado (lote) se lleva a su peso final mediante la adición del agua restante. Esta combinación se lleva a cabo de forma que se evite un aumento significativo de la viscosidad. La viscosidad del producto a granel permanece así preferentemente inferior a 5 mPas, preferentemente inferior a 3,2 mPas durante la etapa de combinación (viscosidad determinada después de filtración tras su disolución en una cantidad de 20 mg en 1 ml de solución acuosa de manitol al 2,5% (p/v)). Esto se puede conseguir humedeciendo el péptido a una velocidad de agitación alta durante un periodo de tiempo relativamente corto (hasta 30 minutos) y después disolviendo el péptido a una velocidad de agitación reducida para evitar la formación de espuma y la agregación (generalmente durante 30 a 90 minutos). La temperatura se mantiene normalmente dentro de un intervalo de 6 - 15 ºC. El agitador es preferentemente uno que proporcione un mezclado turbulento sin vórtice.

Filtración

El producto farmacológico a granel se filtra después preferentemente de forma estéril, por ejemplo a través de dos filtros de grado esterilizante colocados en serie, presurizando el material a granel formulado con nitrógeno.

Llenado

Los viales esterilizados se llenan con el producto farmacológico a granel filtrado y se semi-tapan (posición de secado por congelación) en condiciones asépticas.

Secado por congelación

El secador por congelación se esteriliza preferentemente con vapor antes de su uso. Los viales se colocan en los estantes del secador por congelación. El proceso de secado por congelación posterior comprende preferentemente las etapas de congelación, secado principal (sublimación) y secado secundario. Las condiciones preferidas son las siguientes:

El proceso de secado por congelación comprende preferentemente, o incluso consiste en, tres etapas principales, es decir, congelación, secado principal (sublimación) y secado secundario.

• Congelación

Los viales se cargan en estantes refrigerados mantenidos a 2 a 10 ºC, tal como 5 ºC.

Los estantes se enfrían de, por ejemplo, 5 ºC a de -30 a -40 ºC, tal como -35 ºC. La temperatura de los estantes se mantiene a, por ejemplo, -35 ºC durante un mínimo de dos horas para asegurar la congelación completa de todo el lote antes del comienzo del secado primario.

• Secado principal (sublimación)

El secado principal se realiza reduciendo la presión de la cámara (preferentemente a 0,100 mbar o menos) y aumentando la temperatura de los estantes (preferentemente a de 10 a 20 ºC, tal como +17 ºC).

El tiempo de secado principal transcurre durante al menos 15 horas.

• **Secado secundario**

Después de completar el proceso de secado primario, la presión de la cámara se reduce (preferentemente a 0,01 mbar o menos) y la temperatura de los estantes se aumenta (preferentemente a de 20 a 30 ºC, tal como 25 ºC). El secado secundario se completa normalmente en 7 horas.

El producto farmacológico liofilizado, a continuación, se etiqueta y se envasa y se combina con la cantidad apropiada de líquido de reconstitución.

El líquido de reconstitución se selecciona dependiendo de la viscosidad de la sustancia farmacológica. Si se usa la sustancia farmacológica (1) como material de partida para el proceso de producción A, es decir, una sustancia farmacológica liofilizada que muestra una viscosidad inferior a 3,2 mPas, preferentemente de entre 1,15 y 2 mPas (tras su disolución en una cantidad de 20 mg en 1 ml de solución acuosa de manitol al 2,5% (p/v)), el producto farmacológico liofilizado resultante se combina preferentemente con agua para inyección (WFI) como líquido de reconstitución. Si el producto farmacológico liofilizado se reconstituye con WFI, la viscosidad se encuentra generalmente en el intervalo de 2 a 15 mPas (medida tras la disolución de 20 mg de degarelix (base libre) en 1 ml de WFI). Se ha descubierto que un producto farmacológico con una viscosidad dentro de este intervalo proporciona una liberación de depósito suficiente de degarelix *in vivo*.

Proceso de producción B del producto farmacológico de degarelix

El proceso de producción B es un procedimiento para producir un producto farmacológico de degarelix que comprende un producto farmacológico de degarelix liofilizado y un líquido para reconstitución (fluido de reconstitución) que, tras su reconstitución con dicho líquido en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix/ml, muestra una viscosidad de hasta 15 mPas, preferentemente dentro de un intervalo de 2 a 12 mPas, que comprende las etapas siguientes:

a. Disolver una sustancia farmacológica de degarelix liofilizada en una solución acuosa que contiene manitol para proporcionar una mezcla de degarelix-manitol;

b. Liofilizar la mezcla de degarelix-manitol para proporcionar el producto farmacológico de degarelix,

en el que se añade un agente reductor de la viscosidad a la mezcla de degarelix-manitol antes de la liofilización.

La etapa a también puede denominarse etapa de combinación. En una forma de realización preferida, la filtración y el llenado de viales se llevan a cabo después de la combinación y antes del secado por congelación, de tal manera que todo el proceso de producción B preferido comprende las etapas siguientes:

- Combinación para proporcionar el producto farmacológico a granel sin filtrar
- Filtración (estéril)
- Llenado de viales
- Secado por congelación/liofilización

El proceso de producción B es idéntico al proceso de producción A, con la excepción de que en la etapa de combinación se añade un agente reductor de la viscosidad, preferentemente un tensioactivo no iónico antes de la liofilización. El tensioactivo no iónico se añade preferentemente en una cantidad de 0,0003 a 1,5 mg/ml a la solución a granel, correspondiente a una cantidad de 0,001 a 5 mg/ml, más preferentemente de 0,1 a 1 mg/ml, en el producto farmacológico reconstituido (por ejemplo cuando se reconstituye hasta una concentración de degarelix de 60 mg de base libre de degarelix/ml). Los tensioactivos no iónicos preferidos son aquellos con una cadena de alquilo lineal que tiene al menos 8 átomos de carbono (preferentemente sin dobles enlaces) y un resto de carbohidrato. Se prefieren particularmente aquellos que están aprobados para inyecciones subcutáneas, tales como Tween 20 (polisorbato 20). Otros tensioactivos no iónicos adecuados incluyen succinato de tocoferilo-polietilenglicol-1000 (TPGS) y otros Tweens.

Como material de partida para el proceso de producción B, se usa preferentemente la sustancia farmacológica (2), es decir, una sustancia farmacológica liofilizada que muestra una viscosidad de al menos 3,2 mPas (tras su disolución en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix en 1 ml de solución acuosa de manitol al 2,5% en peso). El producto farmacológico liofilizado resultante se combina normalmente con WFI como líquido de reconstitución. Si el producto farmacológico liofilizado se reconstituye con WFI, la viscosidad se encuentra generalmente en el intervalo de 2 a 15 mPas (medida tras la disolución de 20 mg de base libre de degarelix en 1 ml de WFI). Se ha descubierto que un producto farmacológico con una viscosidad dentro de este intervalo proporciona una formación de depósito suficiente para la liberación retardada de degarelix *in vivo*.

El proceso de producción B es particularmente preferido para productos de degarelix que tienen una concentración de degarelix relativamente alta tras su reconstitución, tal como de 50 mg de base libre de degarelix/ml o superior, por ejemplo 60 mg de base libre de degarelix/ml (240 mg de producto farmacológico).

Producto farmacológico de degarelix novedoso

La divulgación que se refiere al proceso de producción B proporciona un producto farmacológico de degarelix novedoso que difiere de los productos farmacológicos conocidos en que el producto farmacológico reconstituido contiene un agente reductor de la viscosidad. El agente reductor de la viscosidad es el usado en la etapa B, preferentemente un tensioactivo no iónico.

La presente divulgación proporciona, por lo tanto, un producto farmacológico de degarelix que comprende un producto farmacológico de degarelix liofilizado y un líquido para reconstitución que, tras su reconstitución con dicho líquido en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix/ml, muestra una viscosidad de hasta 15 mPas, preferentemente dentro de un intervalo de 2 a 12 mPas, y contiene un agente reductor de la viscosidad en una cantidad de 0,001 a 5 mg/ml, de forma más preferida de 0,1 a 1 mg/ml.

Sección experimental

***Ejemplo 1:* Purificación, desagregación y liofilización**

Se sintetizó degarelix bruto tal como se describe en el documento WO2012/055905 A1, hasta la etapa 12 del ejemplo 5. La etapa 13 tal como se divulga en el documento WO2012/055905 A1 se reemplazó por las etapas siguientes. En resumen, el proceso de purificación de la sustancia farmacológica de degarelix bruta, obtenida después de la última etapa de desprotección, consiste en tres etapas de cromatografía preparativa en fase inversa (RPC), siendo la tercera etapa de RPC principalmente una etapa de desalación.

Etapa 13 (Etapa de purificación):

Se aplicó solución bruta de degarelix de la etapa 12 del documento WO2012/055905A1 a una columna rellena con material de fase inversa, preequilibrada con tampón (90% de TFA al 0,12% y 10% de EtOH). Carga: ≤ 30 g/l de volumen de columna. La columna se lavó y se eluyó con un gradiente: Tampón (EtOH del 29% al 50% y TFA al 0,12% (ac.) del 71% al 50%). Las fracciones obtenidas se analizaron y se combinaron de tal manera que la pureza del material combinado principal cumpliera el criterio de aceptación para el control del proceso.

Cuando la elución se comprobó mediante el procedimiento de HPLC, la pureza fue ≥ 95%.

Etapa 14 (Etapa de purificación):

El material combinado principal obtenido en la etapa 13 se diluyó dos veces con agua y se aplicó a la columna rellena con material de fase inversa, preequilibrada con tampón (90% de AcOH al 1% y 10% de EtOH). Carga: ≤ 25 g/l de volumen de columna. La columna se lavó en primer lugar con un primer tampón (10% de EtOH y 90% de $AcONH_4$ a 0,5 mol/l) y después con un segundo tampón (90% de AcOH al 1% y 10% de EtOH).

La columna se eluyó después con una mezcla de tampón y etanol (76% de AcOH al 1% y 24% de EtOH). Las fracciones obtenidas se analizaron y se combinaron de tal manera que la pureza en el material combinado principal cumpliera los criterios de aceptación para el control del proceso.

Cuando la elución se comprobó mediante el "procedimiento de HPLC", la pureza fue ≥ 975%.

Etapa 15 (Preconcentración/intercambio de sal):

El material combinado principal obtenido en la etapa 14 se diluyó dos veces con agua y se aplicó a la columna rellena con material de fase inversa, preequilibrada con tampón (90% de AcOH al 1% y 10% de EtOH). Carga: ≤ 18 g/l de volumen de columna. La columna se lavó en primer lugar con un primer tampón (10% de EtOH y 90% de $AcONH_4$ a 0,5 mol/l) y después con un segundo tampón (90% de AcOH al 1% y 10% de EtOH). La columna se eluyó después con una mezcla de tampón y etanol (50% de AcOH al 1% y 50% de EtOH).

Como alternativa, el degarelix puede eluirse con una solución de AcOH/MeCN/agua, tal como AcOH al 12% y MeCN al 22% en agua.

Etapa 16 (Concentración-desagregación-liofilización):

Antes de la liofilización, la combinación de soluciones de degarelix puro de la etapa 15 se concentró a una temperatura inferior a 40 ºC. Se añadieron ácido acético acuoso y agua a la solución concentrada, para proporcionar una

concentración inferior a 15 g/l, y una concentración de ácido acético del 30%. A continuación, esta solución se filtró y se liofilizó para producir la sustancia farmacológica de degarelix.

Presión	≤ 05 mbar durante el secado primario y secundario
Temperaturas	Temperatura de congelación final: ≤ -30 ºC
	Temperatura de secado primario final: 20 ºC
	Temperatura de secado secundario final: 20 ºC
Tiempo:	5 días

Resultados

La viscosidad de la sustancia farmacológica obtenida mediante la secuencia de etapas fue inferior a 2,5 mPas, determinada en una concentración de 20 mg/ml en una solución de manitol al 2,5% (p/v).

Ejemplo 2: Procedimiento para medir la viscosidad de la sustancia farmacológica y el producto farmacológico

La determinación de la viscosidad de la sustancia farmacológica y la solución de producto farmacológico se basa en la edición actual del procedimiento de la Ph. Eur. y la USP utilizando un viscosímetro rotatorio equipado con un sistema de medición de cono-placa con D = 60 mm y 1°. La velocidad de cizallamiento se aumenta de 0 a 500 s^{-1} en 20 etapas, usando un programa de etapas de rotación a velocidad controlada (CR) a una temperatura constante de 20 ± 0,2 ºC, asegurando que el sistema alcance el equilibrio antes de que la viscosidad se registre a una velocidad de cizallamiento de 500 s^{-1}.

Ejemplo 3: Procedimiento para medir la densidad óptica para la sustancia farmacológica y el producto farmacológico

Equipo y materiales

- Espectrofotómetro UV
- Cubetas de transmisión de luz UV, trayectoria de 10 mm.
- Tapas de cubeta
- Agua para inyección (utilizada para la reconstitución del producto farmacológico de degarelix y en la celda de referencia)

Realización del análisis

Entre la reconstitución y la medición, las muestras reconstituidas deben mantenerse a 22 ºC ± 1 ºC.

El vial de sustancia farmacológica se reconstituye con una solución acuosa de manitol al 2,5% en agua (p/v). El vial de producto farmacológico se reconstituye con agua para inyección. Se dispensa el disolvente en el vial y se gira el vial hasta que la reconstitución se complete o se utiliza un vórtice durante unos pocos segundos. El líquido debe verse transparente y no deben ser visibles polvo o partículas no disueltas. Se mantiene el vial en posición vertical y sin agitar. La muestra se mide a 350 nm, 120 minutos después de la adición del disolvente.

Cuatro minutos antes de la medición, la muestra tiene que homogeneizarse girando suavemente la cubeta cinco veces hacia adelante y hacia atrás aproximadamente 180 grados. El retraso de cuatro minutos permite que cualquier burbuja de aire presente se disperse antes de la lectura.

La absorción provocada por la cubeta y por el agua para inyección debe deducirse de la lectura de la muestra.

Ejemplo 4: Secado por pulverización

Preparación de la alimentación

En la preparación de la alimentación, la cantidad pesada de degarelix, mostrada en la tabla a continuación, se disolvió usando un agitador magnético. Las diferentes soluciones de alimentación W-VI y AI-IV se prepararon mediante la adición de agua Milli-Q, o ácido acético glacial puro (99,9%) de la forma siguiente:

a. Lote W-IV: se añadió el volumen apropiado de agua a la cantidad pesada de degarelix

b. Lotes A-I a A-III: para cada experimento, se prepararon soluciones de ácido acético diluyendo ácido acético glacial al 99,0% con agua Milli-Q, dando como resultado soluciones al 30, 5, 2 por ciento, a las que se añadió la cantidad pesada de degarelix

Antes de todos los experimentos de secado por pulverización, el péptido reconstituido se filtró en un matraz de medición a través de un filtro Sartoriuos Ministar de 0,20 µm antes del secado por pulverización.

Secado por pulverización

Antes del secado por pulverización, se ajustaron la temperatura de entrada y la velocidad de alimentación. El tubo de la bomba se colocó en la solución de alimentación, y se inició el secado. Cuando se completó el secado, se dejó que la temperatura de entrada disminuyera a 700 ºC antes de desmontar el ciclón y el recipiente de recogida para la recogida de polvo. El polvo se recogió con cepillos en placas de Petri, que se pesaron antes y después de la recogida para determinar el rendimiento.

Visión general del ajuste aplicado para el secado por pulverización

Parámetros				
	W-IV	**A-I**	**A-II**	**A-III**
Temperatura de entrada, ºC	120	120	120	120
Temperatura de salida, ºC	85	85	85	85
Flujo de aire de atomización, l/h	600	600	600	600
Velocidad de alimentación de líquido, ml/min.	3	3	3	3
Velocidad del aspirador, m^3/h	30	30	30	30
Disolvente	agua	AcOH ac. al 30%	AcOH ac. al 5%	AcOH ac. al 2%
Volumen de la solución, ml	25	25	25	25
Cantidad de degarelix	1	1	1	1
Concentración de alimentación, %	4	4	4	4

La viscosidad de degarelix reconstituido secado por pulverización a partir de soluciones de ácido acético de cuatro concentraciones diferentes (A-I a A-III) en comparación con un lote de degarelix secado por pulverización a partir de agua (W-IV)

N.º de lote	W-IV	A-I	A-II	A-III
Viscosidad, mPas*S	2,40	1,68	2,11	2,10

Ejemplo 5: Concentración en columna - liofilización

El material combinado de la etapa 14 del ejemplo 1 se diluyó con agua y se aplicó a una columna rellena con material de fase inversa. Después de enjuagar la columna con AcOH al 1% en agua, se eluyó la degarelix con AcOH al 35% en agua. Las fracciones se ajustaron para que contuvieran 35 g de degarelix/l, AcOH al 27% (Muestra 1) y 15 g de degarelix/l, AcOH al 30% (Muestra 2). Las fracciones ajustadas se secaron por congelación y se analizaron Resultados: véase la tabla siguiente:

Análisis de la sustancia farmacológica	**Muestra 1**	**Muestra 2**
Agua (p/p)	2,1%	2,5%
AcOH residual (p/p)	7,2%	7,0%
DO 20 mg/ml (15 min/6 h)	<0,02 UA/0,02 UA	<0,02 UA/0,02 UA
Viscosidad 20 mg/ml	1,88 mPas	1,94 mPas

Ejemplo 6: Fabricación de la sustancia farmacológica de degarelix y estudios de desagregación

◦ **Materiales**

Estudios de desagregación de sustancia farmacológica bruta purificada

- Se suministró degarelix bruto purificado a una concentración de 57,4 mg/ml
- El ácido acético al 100% se suministró por Merck
- Equipo de desagregación:
  - Recipiente de combinación: recipiente de vidrio de doble pared de 300 ml
  - Frascos de tapa azul, 50 o 100 ml
  - Imán
  - Agitador magnético
- Envasado primario:
  - Viales de vidrio 20R incoloros. Los viales se lavaron y se secaron en una cámara de calor.
  - Tapones de secado por congelación de 20 mm tipo I de acuerdo con las tapas Flip-off de 20 mm de la Ph. Eur/USP

Fabricación de productos farmacológicos usando las sustancias farmacológicas desagregadas

- Se usaron dos sustancias farmacológicas experimentales. Como control, se usa una sustancia farmacológica comercial.

•Manitol: D(-) manitol (PF-05-0232)

- Envasado primario:
  - Viales de vidrio 10R incoloros (según la norma DIN ISO 8362). Los viales se lavan y se secan en una cámara de calor.
  - Tapones de secado por congelación de 20 mm tipo I de acuerdo con las tapas Flip-off de 20 mm de la Ph. Eur/USP (tipo 1319, caucho W4416/50/gris, The West Company)
  - Tapas Flip-off de 20 mm (The West Company)

◦ **Procedimientos**

Experimentos de desagregación utilizando una solución madre de sustancia farmacológica

Temperatura durante los experimentos:

Durante los estudios de desagregación, la temperatura se ajustó a 5, 20, 25 o 35 ºC

Concentración de sustancia farmacológica de degarelix en soluciones madre durante los experimentos: La concentración de sustancia farmacológica de degarelix fue de 5, 15, 25 o 35 mg/ml.

Concentración de ácido acético durante los experimentos:

La concentración de ácido acético es del 13, 15, 18, 20, 22, 26, 30, 35 o 40%.

Análisis realizado durante los experimentos:

Viscosidad: Extracción de ~1,2 ml a T = 1, 60, 120 y 240 minutos.

Si se ajusta mejor en el programa, se toma la muestra en otro punto temporal; esto puede realizarse siempre que se escriba el tiempo correcto en el registro de formulación. Sin embargo, el punto de muestreo a T=1 min debe mantenerse.

Densidad óptica (DO): Debe tomarse una muestra (~1 ml) al final de cada experimento para la medición de la densidad óptica final.

Protocolo del experimento de desagregación, volumen total 20 o 69 ml:

1. Pesar la cantidad requerida de solución madre en un vaso de precipitados. Equilibrar a la temperatura deseada
2. Pesar la cantidad requerida de ácido acético (100%) en un vaso de precipitados
3. Mezclar el ácido acético (100%) con 3 o 10 ml de agua milli-Q y equilibrar a la temperatura deseada
4. Mezclar la solución madre de degarelix con la solución de ácido acético/agua milli-Q
5. Llenar con agua milli-Q hasta 20 o 69 ml
6. Mezclar a fondo
7. Tomar muestras para viscosidad y densidad óptica tal como se ha descrito anteriormente. Obsérvese el aspecto de la solución durante el experimento

Ajustes para la desagregación de los dos soluciones madre de degarelix de 69 ml:

Sustancia farmacológica de degarelix conc. a 25 mg/ml en ambos experimentos

Ácido acético: al 10% o 13%

Temperatura: 5 ºC

Llenado de viales con las dos sustancias farmacológicas desagregadas de ensayo (69 ml) y secado por congelación: Las soluciones desagregadas se cargaron inmediatamente en viales de 20R. Se cargaron 5 ml en cada vial. Los viales y el material a granel deben mantenerse fríos durante el llenado (preferentemente entre 5-10 ºC). Tan pronto como se llenaron los viales, se dispusieron en el secado por congelación y se inició el programa.

Después del secado por congelación y el cierre de los viales, los viales se almacenaron en el secador por congelación a 5 ºC hasta la descarga.

Las dos sustancias farmacológicas secadas por congelación se sometieron a los siguientes análisis:

La viscosidad se midió en muestras de base libre de 20 mg/ml

La densidad óptica se mide en muestras de 20 mg/ml

Contenido de degarelix

Contenido de acetato

◦ **Resultados**

Temp. (ºC)	Conc. de degarelix mg/ml	Conc. de AcOH (%)	Viscosidad a 500 mPa*s Tiempo = 240 min	Densidad óptica Tiempo = 240 minutos
5	5	40	1,9	0,00
5	25	13	2,3	0,10
5	25	15	1,9	0,09
5	25	20	1,7	0,06
5	35	26	1,9	0,08
20	15	30	1,8	0,03
25	25	20	2,0	0,10
35	25	15	7,2	0,86

Temp. (ºC)	Conc. de degarelix mg/ml	Conc. de AcOH (%)	Viscosidad a 500 mPa*s Tiempo = 240 min	Densidad óptica Tiempo = 240 minutos
35	25	18	2,1	0,07
35	25	20	1,7	0,05
35	35	22	2,1	0,13
35	35	26a	1,9	0,10
35	35	30	2,0	0,07
35	35	35	2,1	0,08

Ejemplo 7: Producción de producto farmacológico sin agente reductor de la viscosidad

Combinación de lotes de productos farmacológicos a escala de laboratorio utilizando las dos sustancias farmacológicas desagregadas

Los excipientes enumerados a continuación en la tabla 1 se usan en todos los experimentos de combinación.

Excipientes
Manitol
Agua Milli-Q

Equipo de combinación:

Recipiente de combinación: recipiente de vidrio de doble pared de 300 ml

Frascos de tapa azul, 100 ml

Imán

Agitador magnético

Envasado primario:

- Viales de vidrio 10R incoloros. Los viales se lavaron y se secaron en una cámara de calor.
- Tapones de secado por congelación de 20 mm tipo I
- Tapas Flip-off de 20 mm

Descripción del estudio

Se combinan soluciones a granel de degarelix que contienen 20 mg/g de degarelix y 25 mg/g de manitol usando diferentes lotes de sustancia farmacológica y diferentes ajustes de temperatura.

Las viscosidades de las soluciones a granel se miden durante/después de la combinación en dos ocasiones (después de la disolución y a t = 120 minutos).

Composición del material a granel:

El tamaño del lote y la composición de las dos soluciones a granel se presentan en la tabla 2.

Tabla 1: Tamaño del lote y composición de las soluciones a granel

Tamaño del lote (g)	50
Sustancia farmacológica (g)	1,000 g/sustancia farmacológica con contenido de base libre de degarelix
Manitol (g)	1,25
Agua Milli-Q-Total (g)	Ad. 50

Diseño experimental:

Los parámetros de combinación se proporcionan a continuación en la tabla 2.

Tabla 2: Parámetros de combinación

Tiempo	**Parámetros**
Sustancia farmacológica	Lotes de sustancia farmacológica de ensayo
Temperatura	15 ºC
Velocidad de agitación	50 rpm
Agua, volumen de partida	80%

Combinación:

La combinación se realiza con el agitador colocado en el centro. Antes de comenzar los experimentos, deberá fijarse la posición central.

1. Pesar los ingredientes requeridos
    - o 40 g de agua Milli-Q en el recipiente de combinación.
    - o 1,25 g de manitol en un recipiente adecuado.
    - o Pesar la cantidad exacta de sustancia farmacológica de degarelix (véase la tabla 2) en un recipiente adecuado.
    - o Pesar la cantidad restante de agua Milli-Q en un recipiente adecuado.
2. Conectar el recipiente de combinación de doble pared que contiene el agua Milli-Q al circulador de enfriamiento. Conectar un segundo recipiente de doble pared en serie. El envase que contiene el agua restante se coloca en el segundo recipiente de doble pared para que se equilibre a la temperatura correcta antes de añadirse al material a granel (etapa 9).
3. Colocar cuidadosamente el imán de agitación en el recipiente de combinación. Ajustar la velocidad de agitación a 50 rpm usando el tacómetro.
4. Ajustar el enfriador a la temperatura correcta, iniciar la agitación y añadir el manitol al recipiente de combinación. Agitar hasta que se haya disuelto el manitol.
5. Permitir que el sistema se equilibre a la temperatura establecida.
6. Medir la temperatura en la solución de manitol.
7. Retirar el agitador. Iniciar el temporizador e inmediatamente añadir la sustancia farmacológica. A continuación, volver a insertar el agitador.
8. A t = 5 minutos añadir el resto del agua Milli-Q, uniformemente sobre la superficie de la sustancia farmacológica usando una pipeta Pasteur de vidrio.
9. Cuando solo queden unos pocos grumos, enjuagar la sustancia farmacológica desde los lados del recipiente con el medio de disolución.
10. Cuando la sustancia farmacológica está completamente disuelta, se anota el tiempo y se mide la temperatura. Extraer una muestra para la medición de la viscosidad del material a granel.
11. Continuar el experimento hasta t = 120 minutos. Extraer una muestra para la medición de la viscosidad del material a granel.

Filtrado

Las materiales a granel no se filtrarán debido a que se espera que al menos uno de los lotes este altamente agregado y, por lo tanto, sea muy difícil de filtrar. Además, los lotes no se usarán para fines en los que se requiere esterilidad.

Llenado

Se llenan viales de 10R con 6,40 g de material a granel. Los viales y el material a granel deben mantenerse fríos durante el llenado (preferentemente entre 5-10 ºC). Tan pronto como los viales se llenan, deben colocarse en el secado por congelación y debe iniciarse el programa. Cada material a granel debe dar como resultado aproximadamente 6-7 viales.

◦ **Resultados**

Se procesaron 18 diferentes lotes de sustancia farmacológica, con diferentes viscosidades tal como se indica en la tabla siguiente, tal como se ha descrito anteriormente. La viscosidad de los productos farmacológicos correspondientes se determinó de la forma siguiente:

Lote	Viscosidad DS (20 mg/ml) mPas	Viscosidad DP (20 mg/ml) mPas
1	2,3	5,8
2	2,3	7,81
3	2,1	4,75
4	2,3	8,62
5	2,1	7,85
6	2,1	7,09
7	2,3	7,76
8	2,1	7,69
9	2,1	7,96
10	2,3	8,1
11	1,8	7,82
12	1,7	4,14
13	2,3	8,46
14	2,3	9,57
15	2,3	10,96
16	2,3	8,47
17	2,5	8,05
18	2,5	10,4

Estos resultados se ilustran gráficamente en la figura 1. La figura 1 muestra una correlación entre la viscosidad de la sustancia farmacológica y la viscosidad del producto farmacológico.

Ejemplo 8: Producción de producto farmacológico con agente reductor de la viscosidad

Experimento 1: **Tensioactivos sometidos a ensayo (reconstitución usando WFI/solución de tensioactivo)**

Procedimiento:

- El lote de degarelix se reconstituyó usando WFI (como control) y usando WFI que contiene los tensioactivos. Los viales se reconstituyen a 60 mg/ml de degarelix. El lote de producto farmacológico utilizado para estos experimentos tenía una viscosidad aparente de aproximadamente 3,8 mPas.
- Se prepararon TPGS y Tween 20 en soluciones que contenían 1 mg/ml (soluciones al 0,1%)
- La DO (absorbancia) se midió a 350 nm
- La absorbancia se registró después de 30 min, 60 min, 120 min y 24 horas

Resultado:

Tanto TPCG como Tween 20 redujeron la densidad óptica a un nivel inferior al del control.

Experimento 2: **La reconstitución de viales de degarelix con [WFI + Tween 20] no altera el perfil de liberación *in vitro* (ensayo IVD) de 40 mg/ml de degarelix**

Concentraciones de Tween 20 sometidas a ensayo:

1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml;

Control: WFI

Resultados: Los perfiles de liberación *in vitro* no se alteran por la adición de Tween-20.

Ejemplo 9: Viscosidad y biodisponibilidad del producto farmacológico

Resumen

Se realizó un análisis de datos multivariados con un conjunto de datos de n = 38 lotes de productos farmacológicos de degarelix, que incluían datos farmacocinéticos *in vivo* (modelo de rata).

Se estableció una relación entre las características fisicoquímicas y la farmacocinética *in vivo* en un modelo de rata. El estudio reveló que la viscosidad del producto de degarelix reconstituido parece ser el parámetro destacado y único con alguna capacidad para predecir el rendimiento *in vivo* del depósito.

◦ **Introducción**

El producto farmacológico de degarelix se fabrica como un producto secado por congelación que contiene manitol. Los productos se utilizan como productos medicinales de investigación en estudios clínicos. Se produjeron varias formulaciones, que contenían diversas cantidades de degarelix por vial, concretamente 10 mg, 20 mg, 40 mg, 88 mg, 128 mg, 120 mg (40 mg/ml), 180 mg (60 mg/ml) y 240 mg (60 mg/ml) y diferentes relaciones de degarelix/manitol.

◦ **Materiales**

Se han producido aproximadamente 40 lotes diferentes de degarelix con diferentes lotes de sustancia y formulaciones de degarelix. La concentración estándar de degarelix en el material a granel es de 20 g/l a menos que se indique lo contrario.

◦ **Procedimientos**

▪ **Procedimientos físico-químicos**

Los diferentes procedimientos para caracterizar la agregación se seleccionaron a partir del análisis de datos multivariados. Se compilaron los datos de n = 38 lotes. Sin embargo, se usaron poblaciones más pequeñas para algunos procedimientos que solo se implementaron con algunas formulaciones (por ejemplo, las mediciones a 40 mg/ml no se realizaron con la formulación de 20 mg).

▪ **Bioensayo en ratas**

Se usó un ensayo de rata normalizado que consistía en realizar un seguimiento del perfil farmacocinético de degarelix a lo largo de 28 días. Para evitar efectos secundarios locales, se administró a las ratas degarelix como una suspensión de 20 mg/ml con un volumen de inyección de 100 µl. Se usaron grupos de n=8 ratas, todos tratados con la suspensión reconstituida procedente de un único vial. Las concentraciones en plasma se midieron inicialmente a 2 horas, 1 día, 7 días y 28 días y el AUC parcial se calculó como AUC 0-7 días y AUC 7-28 días. El diseño se cambió entonces omitiendo la medición de la concentración plasmática (Cp)-2 horas y sustituyéndola por Cp-3 días. Asimismo, el AUC 0-7 días se reemplazó por el AUC 1-7 días. Esto explica las discontinuidades en los tamaños de población de algunas de las variables *in vivo*.

▪ **Análisis de datos multivariados**

Dado el tamaño del conjunto de datos, se implementó un enfoque mediante análisis de datos multivariados (PCA y PLS) con el programa informático Simca-P, versión 10 (Umetrics AB, SE-Umeå). Los datos se gestionaron como anteriormente, incluyendo el escalamiento en bloque suave (1/4 raíz), escalamiento a varianza unitaria (UV) y centrado. Los datos de turbidez se transformaron logarítmicamente para mejorar la distribución de datos. Los datos de Cp *in vivo* también se transformaron logarítmicamente para estabilizar la varianza.

Relación entre el rendimiento fisicoquímico e in vivo del producto farmacológico en un modelo de rata

▪ Relación entre el rendimiento fisicoquímico e *in vivo*

Se calculó un primer modelo basándose en 2 componentes. La bondad de ajuste (R2=0,58) fue relativamente baja dada la alta variabilidad de los datos biológicos (20-30%), pero la bondad de predictibilidad (Q2=0,35) fue satisfactoria (R2-Q2 deberá estar en el intervalo de 0,2 a 0,3). Se pudo observar a partir del gráfico de dispersión de carga (no mostrado) que variables tales como la turbidez medida a 20 mg/ml y el contenido de acetato no fueron influyentes.

Por lo tanto, se generó un nuevo modelo excluyendo estas 3 variables (2 variables de turbidez medidas a 20 mg/ml y acetato), basándose en 2 componentes significativos y produciendo una descripción de datos similar (R2=0,53) pero una predictibilidad mejorada (Q2=0,42). Las variables de rata mejor explicadas y predichas fueron concentraciones plasmáticas a 3 días y 28 días (Cp-3d, Cp-28d), y el área bajo la curva entre el día 1 y el día 7 (AUC 1-7d).

El gráfico de visión general de coeficientes indicó que las influencias mayores las portaban los datos de viscosidad respectivamente a 20 mg/ml y después a 40 mg/ml, todos significativos a un nivel de confianza de 0,95 para cada variable biológica. El área superficial específica y la turbidez tuvieron claramente una menor influencia y no fueron significativas, incluso a un nivel de confianza de 0,90.

La relación entre la viscosidad dinámica medida a 20 mg/ml y las mejores variables biológicas ajustadas se muestra en las figuras 2 y 3.

• Conclusión

Se estableció una relación sólida (R2=0,53) entre la viscosidad del producto constituido y el rendimiento *in vivo* tal como se investigó en un modelo de rata. En ambos casos, una viscosidad más alta produjo una liberación reducida del depósito. Otras variables fisicoquímicas no fueron relevantes con la excepción del contenido de acetato para la disolución *in vitro*. Por lo tanto, la viscosidad del producto de degarelix constituido parece ser el parámetro destacado con alguna capacidad para predecir la liberación *in vitro* y el rendimiento *in vivo* del depósito.

REIVINDICACIONES

1. Una sustancia farmacológica de degarelix liofilizada que consiste en degarelix, del 4,5 al 10,0% (p/p) de ácido acético, una cantidad residual de agua e impurezas debidas al proceso de producción, si las hubiera, que muestra, tras su disolución en agua en una cantidad de 20 mg de base libre de degarelix/ml de agua que contiene el 2,5% en peso de manitol, una viscosidad de hasta 3,2 mPas, en la que la viscosidad se mide usando un viscosímetro rotatorio equipado con un sistema de medición de cono-placa con D = 60 mm y 1°, incrementándose la velocidad de cizallamiento de 0 a 500 s^{-1} en 20 etapas, usando un programa de etapas de rotación a velocidad controlada a una temperatura constante de 20+-0,2 ºC.

2. La sustancia farmacológica de degarelix liofilizada según la reivindicación 1, que muestra, tras su disolución en agua en una cantidad de 20 mg de base libre degarelix/ml de agua que contiene el 2,5% en peso de manitol, una viscosidad de 1,15 a 2,0 mPas, en la que la viscosidad se mide usando un viscosímetro rotatorio equipado con un sistema de medición de cono-placa con D = 60 mm y 1°, incrementándose la velocidad de cizallamiento de 0 a 500 s^{-1} en 20 etapas, usando un programa de etapas de rotación a velocidad controlada a una temperatura constante de 20+-0,2 ºC.

3. La sustancia farmacológica de degarelix liofilizada según una o más de las reivindicaciones 1 y 2, que tiene un contenido de agua del 10% o inferior (p/p).

4. Procedimiento para la producción de la sustancia farmacológica de degarelix según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas siguientes:
a. Purificar degarelix tal como se obtiene mediante síntesis peptídica en fase líquida o sólida para obtener una solución de degarelix con una pureza de al menos el 95%;
b. Evaporar el disolvente para concentrar la solución de degarelix para obtener degarelix agregado;
c. Desagregar el degarelix agregado con ácido acético; y
d. Liofilizar el degarelix desagregado para proporcionar la sustancia farmacológica de degarelix.

5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la concentración de ácido acético al final de la etapa c se encuentra en el intervalo del 15 al 35% (v/v).

6. El procedimiento según la reivindicación 4 o 5, en el que la temperatura en la etapa c se encuentra en el intervalo de -5 a 30 ºC.

7. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la concentración de degarelix (base libre) se encuentra en el intervalo de 10 a 35 g/l.

8. Procedimiento para la preparación de la sustancia farmacológica de degarelix según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas siguientes:
a. Purificar degarelix tal como se obtiene mediante síntesis peptídica en fase líquida o sólida para obtener una solución de degarelix con una pureza de al menos el 95%;
b. Cargar la solución de degarelix en una columna cromatográfica;
c. Eluir el degarelix de la columna con ácido acético para proporcionar degarelix eluido;
d. Liofilizar el degarelix eluido para proporcionar la sustancia farmacológica de degarelix.

9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que la concentración de ácido acético en la etapa c se encuentra en el intervalo del 27 al 37% en peso.

10. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 8 a 9, en el que el degarelix eluido se filtra antes de la liofilización.

11. Procedimiento para la producción de la sustancia farmacológica de degarelix según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas siguientes:
a. Purificar degarelix tal como se obtiene mediante síntesis peptídica en fase líquida o sólida para obtener una solución de degarelix con una pureza de al menos el 95%;
b. Ajustar la concentración de ácido acético de la solución de degarelix purificada a del 6 al 40% (p/p), si es necesario;
c. Secar por pulverización la solución de degarelix para proporcionar la sustancia farmacológica de degarelix.

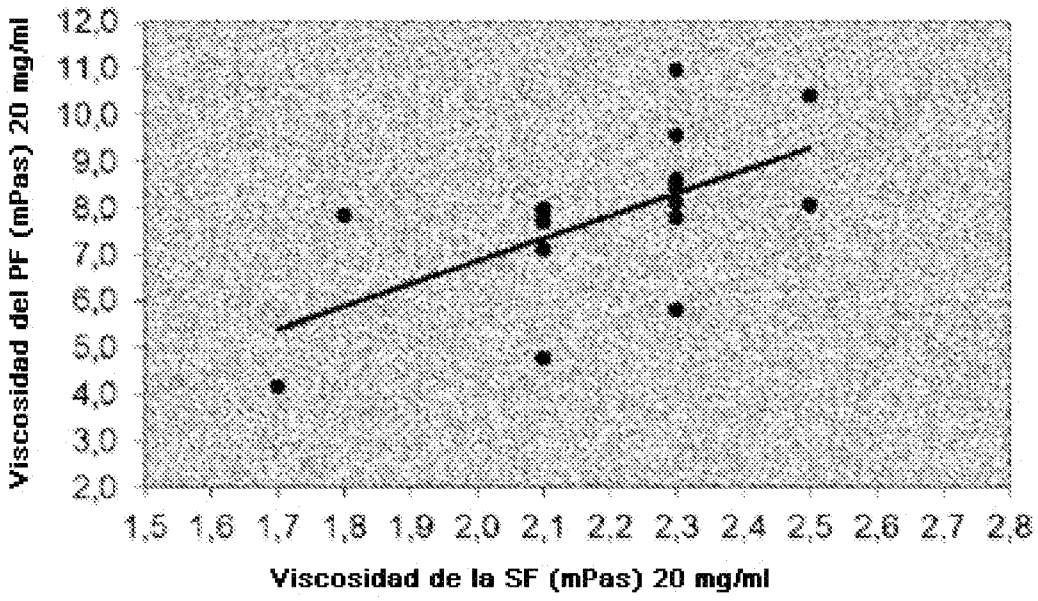

Viscosidad del PF (mPas) 20 mg/ml
12,0
11,0
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,5 1,6 1,7 1,8 1,9 2,0 2,1 2,2 2,3 2,4 2,5 2,6 2,7 2,8
Viscosidad de la SF (mPas) 20 mg/ml

Fig. 1/3

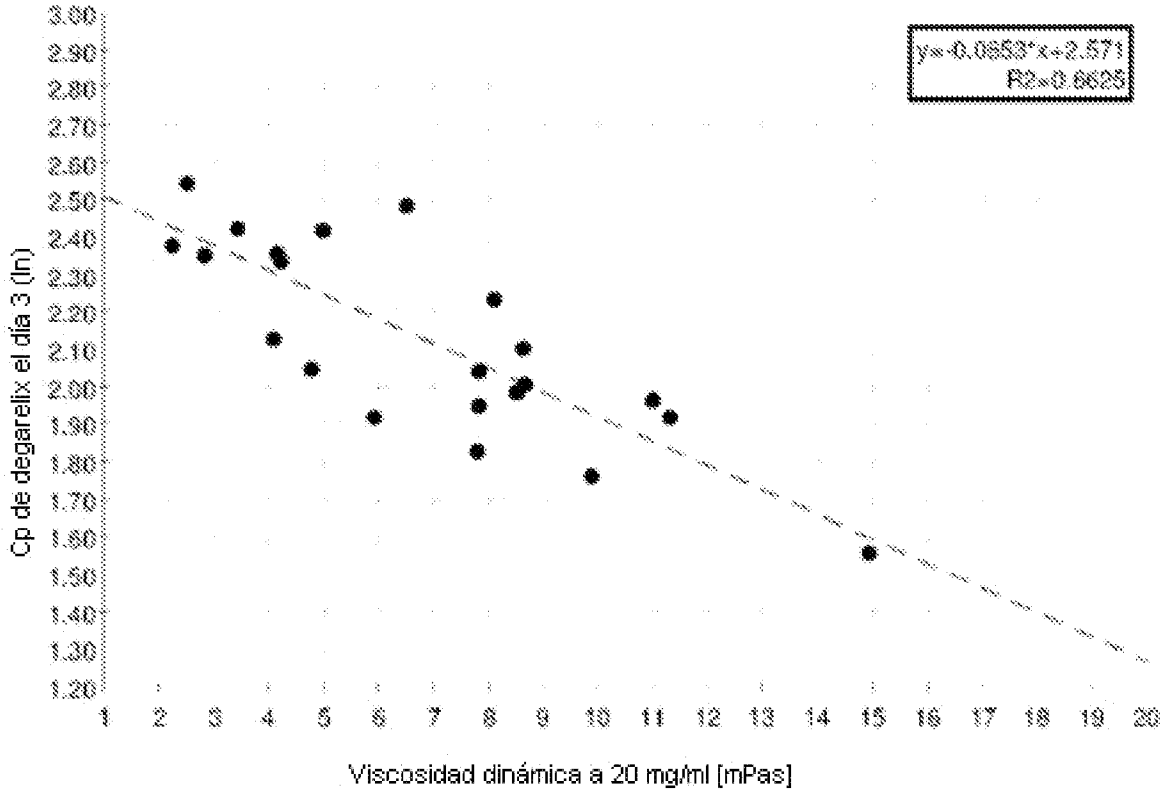

y = -0.0653*x + 2.571
R2 = 0.6625
Cp de degarelix el día 3 (ln)
Viscosidad dinámica a 20 mg/ml [mPas]
3.00
2.90
2.80
2.70
2.60
2.50
2.40
2.30
2.20
2.10
2.00
1.90
1.80
1.70
1.60
1.50
1.40
1.30
1.20
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Fig. 2/3

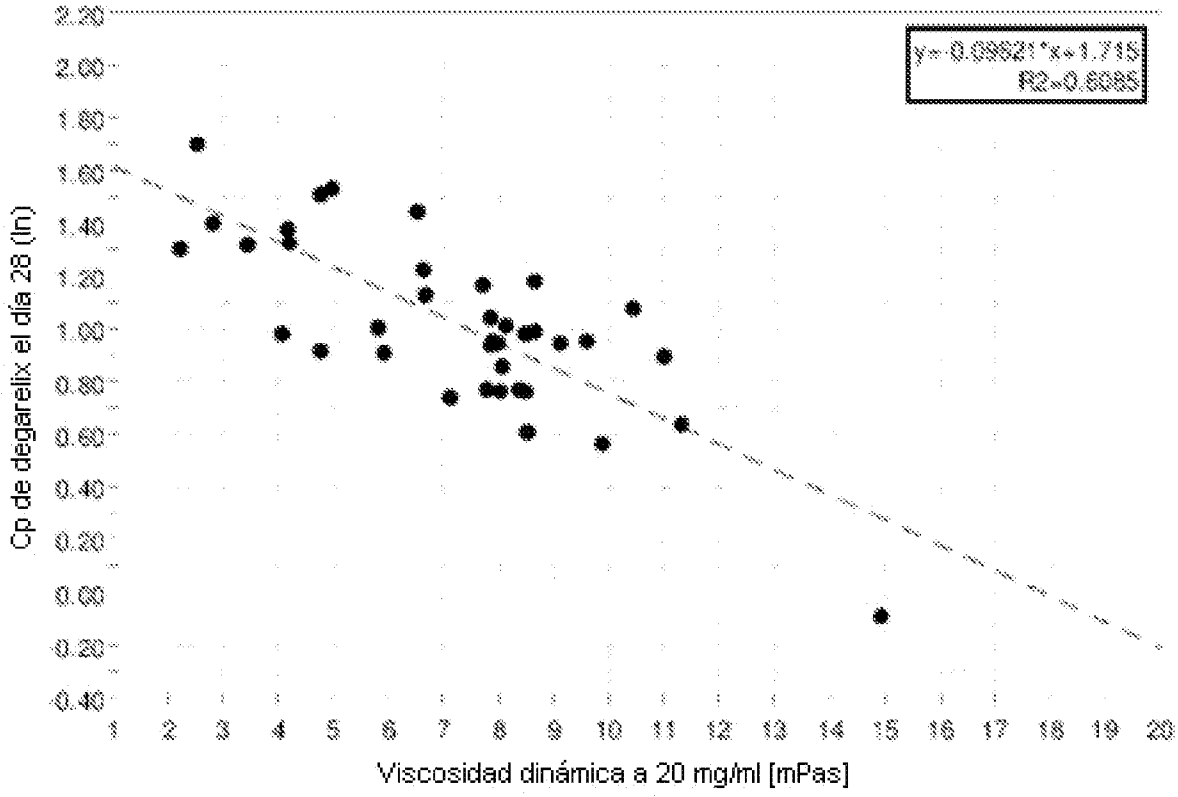

y = 0.0962 1*x + 1.715
R2 = 0.6085
Cp de degarelix el día 28 (ln)
2.20
2.00
1.80
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
-0.20
-0.40
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
Viscosidad dinámica a 20 mg/ml [mPas]

Fig. 3/3