

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 611**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/19** (2006.01)

**A61K 47/10** (2006.01)

**A61K 31/4184** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2006 E 06718390 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 1863452**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de bendamustina para liofilización**

30 Prioridad:

**14.01.2005 US 644354 P**

**12.01.2006 US 330868**

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

**31.05.2013**

73 Titular/es:

**CEPHALON, INC. (100.0%)  
41 MOORES ROAD, P.O. BOX 4011  
FRAZER, PA 19355, US**

72 Inventor/es:

**BRITAIN, JASON, EDWARD y  
FRANKLIN, JOE, CRAIG**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 405 611 T3**

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**

Composiciones farmacéuticas de bendamustina para liofilización

5 **DESCRIPCIÓN****CAMPO DE LA INVENCION**

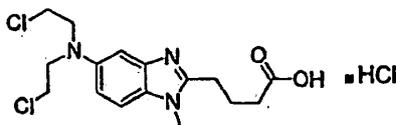
10 La presente invención se refiere al campo de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de diversos estados de enfermedad, especialmente enfermedades neoplásicas y enfermedades autoinmunitarias. Particularmente, se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden mostazas de nitrógeno, particularmente la mostaza de nitrógeno bendamustina, por ejemplo, HCl de bendamustina.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 La siguiente descripción incluye información que puede ser útil en el entendimiento de la presente invención. No es una admisión de que cualquier información tal sea técnica anterior, o relevante, para las invenciones presentemente reivindicadas, o que cualquier publicación citada específicamente o implícitamente sea técnica anterior.

20 Debido a su alta reactividad en disoluciones acuosas, las mostazas de nitrógeno son difíciles de formular como productos farmacéuticos y se suministran frecuentemente para administración en una forma liofilizada que requiere reconstitución, normalmente en agua, por personal hospitalario experto antes de la administración. Una vez en disolución acuosa, las mostazas de nitrógeno se someten a degradación mediante hidrólisis, por tanto, el producto reconstituido debe administrarse a un paciente tan pronto como sea posible después de su reconstitución.

25 La bendamustina, (ácido 4-{5-[bis(2-cloroetil)amino]-1-metil-2-bencimidazolil}butírico, es una estructura atípica con un anillo de bencimidazol cuya estructura incluye una mostaza de nitrógeno activa (véase la Fórmula I, que muestra clorhidrato de bendamustina).

**Formula I**

30 La bendamustina se sintetizó inicialmente en 1963 en la República democrática alemana (RDA) y estuvo disponible de 1971 a 1992 en esa localización bajo el nombre Cytostasan®. Desde entonces se ha comercializado en Alemania con la marca registrada Ribomustin®. Se ha usado ampliamente en Alemania para tratar leucemia linfocítica crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple y cáncer de mama.

35 Debido a su degradación en disoluciones acuosas (como otras mostazas de nitrógeno), la bendamustina se suministra como un producto liofilizado. La presente formulación liofilizada de bendamustina (Ribomustin®) contiene clorhidrato de bendamustina y manitol en una forma liofilizada estéril como un polvo blanco para uso intravenoso tras reconstitución. El liofilizado preparado es inestable cuando se expone a la luz. Por tanto, el producto se almacena en botellas de vidrio marrón o de color ámbar. La presente formulación liofilizada de bendamustina contiene productos de degradación que pueden producirse durante la fabricación del principio activo y/o durante el procedimiento de liofilización para preparar el producto terminado.

40 Actualmente, la bendamustina se formula como un polvo liofilizado para inyección con 100 mg de fármaco por vial de 50 ml o 25 mg de fármaco por vial de 20 ml. Los viales se abren y se reconstituyen en el momento más próximo posible a la administración del paciente. El producto se reconstituye con 40 ml (para la presentación de 100 mg) o 10 ml (para la presentación de 25 mg) de agua estéril para inyección. El producto reconstituido se diluye adicionalmente en 500 ml, c.s.p., de 0,9% de cloruro sódico para inyección. La vía de administración es por infusión intravenosa durante 30 a 60 minutos.

45 Tras la reconstitución con 40 ml de agua estéril para inyección, los viales de bendamustina son estables durante un periodo de 7 horas bajo almacenamiento a temperatura ambiente o durante 6 días tras almacenamiento a 2-8°C. La disolución de mezcla de 500 ml debe administrarse al paciente en el plazo de 7 horas desde la reconstitución del vial (suponiendo almacenamiento a temperatura ambiente de la mezcla).

50 La reconstitución del presente polvo liofilizado de bendamustina es difícil. Informes de la clínica indican que la reconstitución puede requerir al menos quince minutos y puede requerir incluso hasta treinta minutos. Además de ser incómoda y requerir mucho tiempo para el profesional sanitario responsable de reconstituir el producto, la exposición prolongada de la bendamustina al agua durante el procedimiento de reconstitución aumenta las

posibilidades de pérdida de potencia y formación de impurezas debido a la hidrólisis del producto por agua.

Por tanto, existe la necesidad de formulaciones liofilizadas de bendamustina que sean más fáciles de reconstituir y que tengan un mejor perfil de impurezas que las presentes formulaciones de liofilizado (polvo liofilizado) de bendamustina.

La patente alemana (RDA) nº 34727 desvela un procedimiento de preparación de ácidos  $\omega$ -[5-bis-( $\beta$ -cloroetil)-amino-bencimidazolil-(2)]-alcanocarboxílicos sustituidos en la posición 1.

La patente alemana (RDA) nº 80967 desvela una preparación inyectable de clorhidrato de ácido  $\gamma$ -[1-metil-5-bis-( $\beta$ -cloroetil)-amino-bencimidazolil-(2)]-butírico.

La patente alemana (RDA) nº 159877 desvela un procedimiento para preparar ácido 4-[1-metil-5-bis (2-cloroetil)amino-bencimidazolil-2)-butírico.

La patente alemana (RDA) nº 159289 desvela una disolución inyectable de bendamustina.

La monografía de producto de la bendamustina Ribomustin® (actualizada 1/2002) [http://www.ribosepharm.de/pdf/ribomusfin\\_bendamustin/productmonograph.pdf](http://www.ribosepharm.de/pdf/ribomusfin_bendamustin/productmonograph.pdf) proporciona información sobre Ribomustin® que incluye descripción del producto.

Ni y col. informan de que la nitrosourea SarCNU fue más estable en *tert*-butanol puro que en ácido acético puro, sulfóxido de dimetilo, metilhidroxi, agua o en mezclas de TBA/agua (Ni y col. (2001) Intl. J. Pharmaceutics 226:39-46).

La ciclofosfamida liofilizada se conoce en la técnica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.418.223; 5.413.995; 5.268.368; 5.227.374; 5.130.305; 4.659.699; 4.537.883; y 5.066.647.

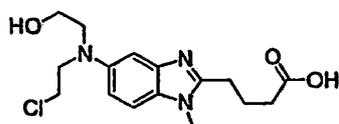
La mostaza de nitrógeno liofilizada ifosfamida se desvela en la publicación internacional nº WO 2003/066027; patentes de EE.UU. nº 6.613.927; 5.750.131; 5.972.912; 5.227.373; y 5.204.335.

Teagarden y col. desvelan formulaciones liofilizadas de prostaglandina E-1 preparadas disolviendo PGE-1 en una disolución de lactosa y alcohol *tert*-butílico (patente de EE.UU. nº 5.770.230).

## RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una preparación liofilizada de bendamustina o clorhidrato de bendamustina; una formulación para la liofilización que comprende bendamustina o clorhidrato de bendamustina y una composición farmacéutica pre-liofilizada de bendamustina como se define en las reivindicaciones adjuntas.

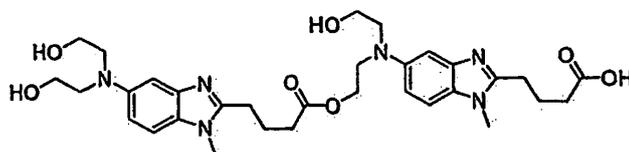
Se desvela una composición farmacéutica de bendamustina que contiene no más de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 0,9% (porcentaje en área de bendamustina) de HP1, como se muestra en la Fórmula II



Formula II

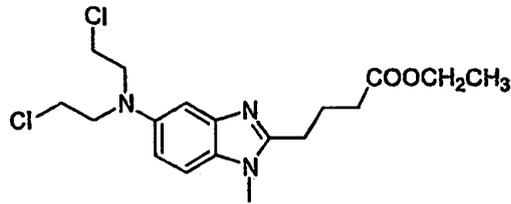
en el momento de la liberación o cuando la HP1 es la cantidad de HP1 presente en el tiempo cero después de la reconstitución de una composición farmacéutica liofilizada de bendamustina como se describe en el presente documento.

Se desvela una preparación liofilizada de bendamustina que contiene no más de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,3% de dímero de bendamustina como se muestra en la Fórmula III en la liberación o en el tiempo cero después de la reconstitución



Formula III.

Se desvela una preparación liofilizada de bendamustina que contiene no más de aproximadamente el 0,5%, preferentemente el 0,15% a aproximadamente el 0,5%, de éster etílico de bendamustina, como se muestra en la Fórmula IV en la liberación o en el tiempo cero después de la reconstitución



Formula IV.

Se desvela una forma de dosificación farmacéutica que incluye una composición farmacéutica de bendamustina que contiene no más de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 0,9% de HP1, preferentemente no más de aproximadamente el 0,50%, preferentemente no más de aproximadamente el 0,45%, más preferentemente no más de aproximadamente el 0,40%, más preferentemente no más de aproximadamente el 0,35%, incluso más preferentemente no más del 0,30%, en la que HP1 es la cantidad de HP1 presente en la liberación o en el tiempo cero después de la reconstitución de una preparación liofilizada de bendamustina.

La invención también desvela procedimientos para preparar una preparación liofilizada de bendamustina que incluye disolver bendamustina en una concentración estabilizante de un disolvente de alcohol de entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 100% (v/v) de alcohol para formar una disolución de pre-liofilización; y liofilizar la disolución de pre-liofilización; en los que la preparación liofilizada de bendamustina preparada a partir de tales procedimientos contiene no más de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 0,9%, preferentemente el 0,5% (porcentaje en área de bendamustina) de HP1 como se muestra en la Fórmula II, en la que dicha HP1 es la cantidad de HP1 presente en el tiempo cero después de la reconstitución de la composición farmacéutica liofilizada de bendamustina. Otras concentraciones de alcohol incluyen aproximadamente el 5% a aproximadamente el 99,9%, aproximadamente el 5% a aproximadamente el 70%, aproximadamente el 5% a aproximadamente el 60%, aproximadamente el 5% a aproximadamente el 50%, aproximadamente el 5% a aproximadamente el 40%, aproximadamente el 20% a aproximadamente 35%. Concentraciones preferidas de alcohol son de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 30%. El alcohol es *terc*-butanol. Una concentración preferida de *terc*-butanol es aproximadamente el 20% a aproximadamente el 30%, preferentemente aproximadamente el 30%. Un aspecto de esta realización es la adición de un excipiente antes de la liofilización. Un excipiente preferido es manitol. Concentraciones pre-liofilizadas preferidas de bendamustina son de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml.

En un procedimiento preferido para preparar una preparación liofilizada de bendamustina, liofilizar la disolución de pre-liofilización comprende i) congelar la disolución de pre-liofilización a una temperatura por debajo de aproximadamente -40°C, preferentemente -50°C, para formar una disolución congelada; ii) mantener la disolución congelada a o por debajo de -40°C, preferentemente -50°C, durante al menos 2 horas; iii) elevar la disolución congelada a una temperatura de secado primario entre aproximadamente -40°C y aproximadamente -10°C para formar una disolución secada; iv) mantener durante aproximadamente 10 a aproximadamente 70 horas; v) elevar la disolución secada a una temperatura de secado secundario entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 40°C; y vii) mantener durante aproximadamente 5 a aproximadamente 40 horas para formar una preparación liofilizada de bendamustina. En un procedimiento más preferido, liofilizar la disolución de pre-liofilización comprende i) congelar la disolución de pre-liofilización a aproximadamente -50°C para formar una disolución congelada; ii) mantener la disolución congelada a aproximadamente -50°C durante al menos 2 horas a aproximadamente 4 horas; iii) elevar a una temperatura de secado primario entre aproximadamente -20°C y aproximadamente -12°C para formar una disolución secada; iv) mantener a una temperatura de secado primario durante aproximadamente 10 a aproximadamente 48 horas; v) elevar la disolución secada a una temperatura de secado secundario entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 40°C; y vi) mantener a una temperatura de secado secundario durante al menos 5 horas hasta aproximadamente 20 horas. El alcohol es *terc*-butanol. Una concentración preferida de *terc*-butanol es aproximadamente el 20% a aproximadamente el 30%, preferentemente aproximadamente el 30%. Un aspecto de esta realización es la adición de un excipiente antes de la liofilización. Un excipiente preferido es manitol. Concentraciones pre-liofilizadas preferidas de bendamustina son de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 5,0 mg/ml.

La invención también implica formulaciones de bendamustina para liofilización que incluyen un excipiente y una concentración estabilizante de un disolvente orgánico. Una formulación preferida incluye bendamustina a una concentración de aproximadamente 15 mg/ml, manitol a una concentración de aproximadamente 25,5 mg/ml, alcohol *terc*-butílico a una concentración de aproximadamente 30% (v/v) y agua.

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas pre-liofilizadas de bendamustina. Una

composición pre-liofilizada preferida incluye HCl de bendamustina aproximadamente 15 mg/ml, manitol aproximadamente 25,5 mg/ml, aproximadamente 30% (v/v) de alcohol *terc*-butílico y agua.

5 Estas y otras realizaciones de la invención se describen más adelante en el presente documento o son evidentes para expertos habituales en la materia basándose en las siguientes divulgaciones.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La Fig. 1 muestra la solubilidad de bendamustina a diversas temperaturas para dos disoluciones de bendamustina diferentes en *terc*-butanol.

15 La Fig. 2 muestra los resultados de pureza de un análisis de HPLC después de incubar bendamustina en diversos alcoholes durante 24 horas a 5°C. Los resultados se presentan como el porcentaje en área del pico de bendamustina.

La Fig. 3 muestra la formación de HP1 (Fórmula II) después de 24 horas en diversos co-disolventes de alcohol/agua a 5°C

20 La Fig. 4 muestra la formación de dímero (Fórmula III) después de 24 horas en diversos co-disolventes de alcohol/agua a 5°C

La Fig. 5 muestra un ciclo de liofilización para bendamustina usando un co-disolvente de TBA/agua.

25 La Fig. 6 muestra un cromatograma para Ribomustin® usando el procedimiento de HPLC nº 1.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 Como se usa en el presente documento, los términos “formular” se refiere a la preparación de un fármaco, por ejemplo, bendamustina, en una forma adecuada para administración a un paciente mamífero, preferentemente un ser humano. Por tanto, “formulación” puede incluir la adición de excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

35 Como se usa en el presente documento, el término “polvo liofilizado” o “preparación liofilizada” se refiere a cualquier material sólido obtenido por liofilización, es decir, liofilización de una disolución acuosa. La disolución acuosa puede contener un disolvente no acuoso, es decir, una disolución compuesta por un disolvente acuoso y uno o más disolventes no acuosos. Preferentemente, una preparación liofilizada es una en la que el material sólido se obtiene liofilizando una disolución compuesta por un disolvente acuoso y uno o más disolventes no acuosos, más preferentemente el disolvente no acuoso es un alcohol.

40 Por “composición farmacéutica estable” se indica cualquier composición farmacéutica que tiene estabilidad suficiente para tener utilidad como producto farmacéutico. Preferentemente, una composición farmacéutica estable tiene estabilidad suficiente para permitir el almacenamiento a una temperatura conveniente, preferentemente entre -20°C y 40°C, más preferentemente aproximadamente 2°C a aproximadamente 30°C, durante un periodo de tiempo razonable, por ejemplo, pudiendo ser la estabilidad en almacén del producto tan corta como un mes, pero es  
45 normalmente seis meses o más, más preferentemente un año o más, incluso más preferentemente veinticuatro meses o más, e incluso más preferentemente treinta y seis meses o más. La estabilidad en almacén o expiración puede ser esa cantidad de tiempo en la que el principio activo se degrada a un punto por debajo del 90% de pureza. Para los fines de la presente invención, composición farmacéutica estable incluye referencia a composiciones farmacéuticas con intervalos específicos de impurezas como se describe en el presente documento.  
50 Preferentemente, una composición farmacéutica estable es una que tiene degradación mínima del principio activo, por ejemplo, retiene al menos aproximadamente el 85% de activo sin degradar, preferentemente al menos aproximadamente el 90%, y más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, después de almacenamiento a 2-30°C durante un periodo de tiempo de 2-3 años.

55 Por “preparación liofilizada estable” se indica cualquier preparación liofilizada que tenga suficiente estabilidad, como tales características se definen similarmente en el presente documento para una composición farmacéutica estable, por tener utilidad como producto farmacéutico.

60 Por “degradado” se indica que el activo ha experimentado un cambio en la estructura química.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” como se usa en el presente documento se refiere a esa cantidad del compuesto que se administra que aliviará hasta cierto grado uno o más de los síntomas del trastorno que está tratándose. En referencia al tratamiento de neoplasias, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a esa cantidad que tiene el efecto de (1) reducir el tamaño del tumor, (2) inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto grado, preferentemente detener) la metástasis del tumor, (3) inhibir hasta cierto grado (es decir, ralentizar hasta cierto grado, preferentemente detener) el crecimiento tumoral y/o (4) aliviar hasta cierto grado (o, preferentemente,

eliminar) uno o más síntomas asociados al cáncer. Cantidad terapéuticamente eficaz también puede significar prevenir que se produzca la enfermedad en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que todavía no ha experimentado o presenta síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico). Además, cantidad terapéuticamente eficaz puede ser esa cantidad que aumenta la esperanza de vida de un paciente aquejado de un trastorno terminal. Dosis terapéuticamente eficaces típicas para bendamustina para el tratamiento de linfoma no Hodgkin pueden ser de aproximadamente 60-120 mg/m<sup>2</sup> administradas como una dosis única en dos días consecutivos. El ciclo puede repetirse aproximadamente cada tres a cuatro semanas. Para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica (LLC), la bendamustina puede administrarse a aproximadamente 80-100 mg/m<sup>2</sup> en los días 1 y 2. El ciclo puede repetirse después de aproximadamente 4 semanas. Para el tratamiento de enfermedad de Hodgkin (estadios II-IV), la bendamustina puede administrarse en la "pauta de DBVBe" con daunorubicina 25 mg/m<sup>2</sup> en los días 1 y 15, bleomicina 10 mg/m<sup>2</sup> en los días 1 y 15, vincristina 1,4 mg/m<sup>2</sup> en los días 1 y 15 y bendamustina 50 mg/m<sup>2</sup> en los días 1-5 con repetición del ciclo aproximadamente cada 4 semanas. Para cáncer de mama, la bendamustina (120 mg/m<sup>2</sup>) en los días 1 y 8 puede administrarse en combinación con metotrexato 40 mg/m<sup>2</sup> en los días 1 y 8, y 5-fluorouracilo 600 mg/m<sup>2</sup> en los días 1 y 8 con repetición del ciclo aproximadamente cada 4 semanas. Como segunda línea de terapia para cáncer de mama, la bendamustina puede administrarse a aproximadamente 100-150 mg/m<sup>2</sup> en los días 1 y 2 con repetición del ciclo aproximadamente cada 4 semanas.

Como se usa en el presente documento, "neoplásico" se refiere a una neoplasia, que es un crecimiento anormal, produciéndose tal crecimiento debido a una proliferación de células no sometidas a las limitaciones usuales de crecimiento. Como se usa en el presente documento, "agente antineoplásico" es cualquier compuesto, composición, mezcla, co-mezcla o combinación que inhibe, elimina, retarda o invierte el fenotipo neoplásico de una célula.

Como se usa en el presente documento, "hiperproliferación" es la producción en exceso de células en respuesta a un factor de crecimiento particular. Los "trastornos hiperproliferativos" son enfermedades en las que las células se producen en exceso en respuesta a un factor de crecimiento particular. Ejemplos de tales "trastornos hiperproliferativos" incluyen retinopatía diabética, psoriasis, endometriosis, cáncer, trastornos degenerativos maculares y trastornos de crecimiento benigno tales como agrandamiento de la próstata.

Como se usa en el presente documento, el término "vial" se refiere a cualquier recipiente con paredes, tanto rígido como flexible.

"Controlar" como se usa en el presente documento significa poner en su sitio los controles del procedimiento para facilitar el logro de la cosa que se controla. Por ejemplo, en un caso dado, "controlar" puede significar probar muestras de cada lote o varios lotes regularmente o aleatoriamente; fijar la concentración de degradantes como una especificación de liberación; seleccionar condiciones de procedimiento, por ejemplo, uso de alcoholes y/u otros disolventes orgánicos en la disolución o dispersión de pre-liofilización, de manera que se asegure que la concentración de degradantes del principio activo no sea inaceptablemente alta; etc. El controlar los degradantes fijando especificaciones de liberación para la cantidad de degradantes puede usarse para facilitar la aprobación reguladora de un producto farmacéutico por una agencia reguladora tal como la Agencia estadounidense del medicamento y agencias similares en otros países o regiones ("agencia").

El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa que la cosa que es farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, componentes, que incluyen recipientes, de una composición farmacéutica, no produce pérdida inaceptable de actividad farmacológica o efectos secundarios adversos inaceptables. Ejemplos de componentes farmacéuticamente aceptables se proporcionan en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), el Formulario nacional (NF), adoptado en la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos, celebrada en Rockville, Md. en 1990 y FDA Inactive Ingredient Guide 1990, 1996 concedida por la Agencia estadounidense del medicamento. También pueden usarse otras calidades de disoluciones o componentes que cumplen límites necesarios y/o especificaciones que están fuera de la USP/NF.

El término "composición farmacéutica" como se usa en el presente documento debe significar una composición que se hace en condiciones de forma que sea adecuada para administración a seres humanos, por ejemplo, se hace bajo condiciones de GMP y contiene excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sin limitación, estabilizadores, agentes de carga, tampones, vehículos, diluyentes, vehículos, solubilizantes y aglutinantes. Como se usa en el presente documento, la composición farmacéutica incluye, pero no se limita a, una disolución o dispersión de pre-liofilización, además de una forma líquida lista para inyección o infusión después de la reconstitución de una preparación liofilizada.

Una "forma de dosificación farmacéutica" como se usa en el presente documento significa que las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento están en un recipiente y en una cantidad adecuada para reconstitución y administración de una o más dosis, normalmente aproximadamente 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-10 o aproximadamente 1-20 dosis. Preferentemente, una "forma de dosificación farmacéutica" como se usa en el presente documento significa una composición farmacéutica liofilizada desvelada en el presente documento en un recipiente y en una cantidad adecuada para reconstitución y administración de una o más dosis, normalmente aproximadamente 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-10, o aproximadamente 1-20 dosis. La forma de dosificación farmacéutica puede comprender un vial o jeringuilla u otro recipiente adecuado farmacéuticamente aceptable. La forma de

dosificación farmacéutica adecuada para uso en inyección o infusión puede incluir disoluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden un principio activo que están adaptadas para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables o infusibles estériles. En todos los casos, la forma de dosificación definitiva debe ser estéril, líquida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El soporte o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol tal como glicerol, propilenglicol, o polietilenglicoles líquidos y similares, aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos, y mezclas adecuadas de los mismos. La prevención del crecimiento de microorganismos puede llevarse a cabo por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares.

Como se usa en el presente documento, el término “excipiente” significa las sustancias usadas para formular principios activos farmacéuticos (PAF) en formulaciones farmacéuticas; en una realización preferida, un excipiente no reduce o interfiere con el efecto terapéutico primario del PAF. Preferentemente, un excipiente es terapéuticamente inerte. El término “excipiente” engloba soportes, diluyentes, vehículos, solubilizantes, estabilizadores, agentes de carga y aglutinantes. Excipientes también pueden ser aquellas sustancias presentes en una formulación farmacéutica como resultado indirecto o involuntario del procedimiento de fabricación. Preferentemente, los excipientes están autorizados para o se consideran que son seguros para administración humana y animal, es decir, sustancias GRAS (generalmente consideradas seguras). Las sustancias GRAS están enumeradas por la Agencia estadounidense del medicamento en el Código de normas federales (CFR) en el artículo 21 del CFR apartado 182 y 21 del CFR apartado 184. Excipientes preferidos incluyen, pero no se limitan a, hexitoles, que incluye manitol y similares.

Como se usa en el presente documento, “una concentración estabilizante de un disolvente orgánico” o “una concentración estabilizante de un alcohol” significa la cantidad de un disolvente orgánico o alcohol que reduce el nivel de degradación de la bendamustina para alcanzar un nivel especificado de degradantes en el producto terminado final. Por ejemplo, con respecto al degradante HP1, una concentración estabilizante de un disolvente orgánico es esa cantidad que produce una concentración de HP1 (porcentaje en área de bendamustina) inferior a aproximadamente el 0,5%, preferentemente inferior al 0,45%, preferentemente inferior al 0,40%, más preferentemente inferior al 0,35%, más preferentemente inferior al 0,30%, e incluso más preferentemente inferior al 0,25%. Con respecto a la concentración de degradante global o total del producto terminado final, una concentración estabilizante de un disolvente orgánico es esa cantidad que produce una concentración de degradante total (en el momento de la liberación del producto terminado) inferior a aproximadamente el 7% (porcentaje en área de bendamustina), preferentemente inferior a aproximadamente el 6%, más preferentemente inferior a aproximadamente el 5%, e incluso más preferentemente inferior a aproximadamente el 4,0%. Por “porcentaje en área de bendamustina” se indica la cantidad de un degradante especificado, por ejemplo, HP1, con respecto a la cantidad de bendamustina como se determina, por ejemplo, por HPLC.

El término “disolvente orgánico” significa un material orgánico, normalmente un líquido, que puede disolver otras sustancias.

Como se usa en el presente documento, “cantidad traza de un disolvente orgánico” significa una cantidad de disolvente que es igual a o inferior a niveles recomendados para productos farmacéuticos, por ejemplo, como se recomienda por las pautas de la ICH (Conferencia internacional sobre armonización, Impurezas - Pautas para disolventes residuales. Q3C. Registro federal. 1997;62(247):67377). El límite más bajo es la menor cantidad que puede detectarse.

El término “liberación” o “en la liberación” significa que el producto terminado ha cumplido las especificaciones de liberación y puede usarse para su fin farmacéutico previsto.

#### A. Parte general

La invención proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables estables preparadas a partir de bendamustina. En particular, la invención proporciona formulaciones para la liofilización de HCl de bendamustina. El polvo liofilizado obtenido de tales formulaciones se reconstituye más fácilmente que el polvo liofilizado de bendamustina presentemente disponible. Además, los productos liofilizados tienen un mejor perfil de impurezas que Ribomustin® con respecto a ciertas impurezas, en particular HP1, dímero de bendamustina y éster etílico de bendamustina, antes de la reconstitución, tras el almacenamiento del liofilizado, o tras la reconstitución y mezcla.

Se desvelan formulaciones de bendamustina útiles para tratar enfermedades neoplásicas. Las formulaciones descritas en el presente documento pueden administrarse solas o en combinación con al menos un agente antineoplásico adicional y/o terapia radiactiva.

Se desvelan condiciones y medios para potenciar la estabilidad de la bendamustina antes de y durante el procesamiento de liofilización, tras el almacenamiento en almacén o tras la reconstitución.

Agentes antineoplásicos que pueden utilizarse en combinación con las formulaciones incluyen aquellos

proporcionados en Merck Index 11, pág. 16-17, Merck & Co., Inc. (1989) y The Chemotherapy Source Book (1997). Ambos libros son ampliamente reconocidos y están fácilmente disponibles para el experto.

Hay grandes números de agentes antineoplásicos disponibles en uso comercial, en evaluación clínica y en desarrollo preclínico, que podrían seleccionarse para el tratamiento de neoplasia por quimioterapia de combinación de fármacos. Tales agentes antineoplásicos se clasifican en varias categorías importantes, concretamente, agentes tipo antibióticos, fármacos de unión a ADN covalente, agentes antimetabolitos, agentes hormonales, que incluyen glucocorticoides tales como prednisona y dexametasona, agentes inmunológicos, agentes tipo interferón, agentes de diferenciación tales como los retinoides, agentes pro-apoptóticos y una categoría de agentes variados, que incluye compuestos tales como ARN interferente pequeño antisentido, y similares. Alternativamente, pueden usarse otros agentes antineoplásicos tales como inhibidores de proteasas de metalomatrix (MMP), miméticos de SOD o inhibidores alfa<sub>v</sub> betas.

Una familia de agentes antineoplásicos que puede usarse en combinación con los compuestos consiste en agentes antineoplásicos tipo antimetabolito. Agentes antineoplásicos antimetabolitos adecuados pueden seleccionarse del grupo que consiste en alanosina, AG2037 (Pfizer), 5-FU-fibrinógeno, ácido acantifólico, aminotiadiazol, brequinar sodio, carmofur, CGP-30694 de Ciba-Geigy, ciclopentilcitosina, fosfato-estearato de citarabina, conjugados de citarabina, DATHF de Lilly, DDFC de Merrel Dow, dezaguanina, didesoxicitidina, didesoxiguanosina, didox, DMDC de Yoshitomi, doxifluridina, EHNA de Wellcome, EX-015 de Merck & Co., fazarabina, floxuridina, fosfato de fludarabina, 5-fluorouracilo, N-(2'-furanidil)-5-fluorouracilo, FO-152 de Daiichi Seiyaku, isopropilpirrolizina, LY-188011 de Lilly, LY-264618 de Lilly, metobenzaprim, metotrexato, MZPES de Wellcome, norspermidina, NSC-127716 de NCI, NSC-264880 de NCI, NSC-39661 de NCI, NSC-612567 de NCI, PALA de Warner-Lambert, pentostatina, piritrexim, plicamicina, PL-AC de Asahi Chemical, TAC-788 de Takeda, tioguanina, tiazofurina, TIF de Erbamont, trimetrexato, inhibidores de tirosina cinasas, inhibidores de proteínas tirosina cinasas, UFT de Taiho y uricitina.

Una segunda familia de agentes antineoplásicos que puede usarse en combinación con los compuestos consiste en agentes de unión de ADN covalente. Agentes antineoplásicos tipo alquilantes adecuados pueden seleccionarse del grupo que consiste en 254-S de Shionogi, análogos de aldo-fosfamida, altretamina, anaxirona, BBR-2207 de Boehringer Mannheim, bestrabucilo, budotitano, CA-102 de Wakunaga, carboplatino, carmustina, Chinoin-139, Chinoin-153, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, CL-286558 de American Cyanamid, CY-233 de Sanofi, ciplatato, D-19-384 de Degussa, DACHP(My<sub>2</sub>) de Sumimoto, difenilespiromustina, diplatino citostático, derivados de distamicina de Erba, DWA-2114R de Chugai, E09 de ITI, elmustina, FCE-24517 de Erbamont, fosfato sódico de estramustina, fotemustina, G-6-M de Unimed, GYKI-17230 de Chinoin, hepsul-fam, ifosfamida, iroplatinato, lomustina, mafosfamida, melfalan, mitolactol, NK-121 de Nippon Kayaku, NCINSC-264395, NSC-342215 de NCI, oxaliplatino, PCNU de Upjohn, prednimustina, PTT-119 de Proter, ranimustina, semustina, SK&F-101772 de SmithKline, SN-22 de Yakult Honsha, espiromustina, TA-077 de Tanabe Seiyaku, tauromustina, temozolomida, teroxirona, tetraplatino y trimelamol.

Otra familia de agentes antineoplásicos que puede usarse en combinación con los compuestos desvelados en el presente documento consiste en agentes antineoplásicos tipo antibiótico. Agentes antineoplásicos tipo antibiótico adecuados pueden seleccionarse del grupo que consiste en 4181-A de Taiho, aclarubicina, actinomicina D, actinoplanona, alanosina, ADR-456 de Erbamont, derivado de aeroplisinina, AN-201-II de Ajinomoto, AN-3 de Ajinomoto, anisomicinas de Nippon Soda, antraciclina, azino-micina-A, bisucaberina, BL-6859 de Bristol-Myers, BMY-25067 de Bristol-Myers, BMY-25551 de Bristol-Myers, BMY-26605 de Bristol-Myers, BMY-27557 de Bristol-Myers, BMY-28438 de Bristol-Myers, sulfato de bleomicina, briostatina-1, C-1027 de Taiho, caliquemicina, cromoximicina, dactinomicina, daunorubicina, DC-102 de Kyowa Hakko, DC-79 de Kyowa Hakko, DC-88A de Kyowa Hakko, DC89-AI de Kyowa Hakko, DC92-B de Kyowa Hakko, ditrisarubicina B, DOB-41 de Shionogi, doxorubicina, doxorubicina-fibrinógeno, elsamicina-A, epirubicina, erbstatina, esorubicina, esperamicina-A1, esperamicina-Alb, FCE-21954 de Erbamont, FK-973 de Fujisawa, fostriecina, FR-900482 de Fujisawa, glidobactina, gregatina-A, grincamicina, herbimicina, idarubicina, iludinas, kzasamicina, kesarirodinas, KM-5539 de Kyowa Hakko, KRN-8602 de Kirin Brewery, KT-5432 de Kyowa Hakko, KT-5594 de Kyowa Hakko, KT-6149 de Kyowa Hakko, LL-D49194 de American Cyanamid, ME 2303 de Meiji Seika, menogarilo, mitomicina, mitoxantrona, M-TAG de SmithKline, neoactina, NK-313 de Nippon Kayaku, NKT-01 de Nippon Kayaku, NSC-357704 de SRI International, oxalisina, oxaunomicina, peplomicina, pilatin, pirarubicina, porotramicina, pirindamicina A, RA-I de Tobishi, rapamicina, rizoxina, rodorubicina, sibanomicina, siwenmicina, SM-5887 de Sumitomo, SN-706 de Snow Brand, SN-07 de Snow Brand, sorangicina-A, esparsomicina, SS-21020 de SS Pharmaceutical, SS-7313B de SS Pharmaceutical, SS-9816B de SS Pharmaceutical, estefimicina B, 4181-2 de Taiho, talisomicina, TAN-868A de Takeda, terpentecina, trazina, ticrozarina A, U-73975 de Upjohn, UCN-10028A de Kyowa Hakko, WF-3405 de Fujisawa, Y-25024 de Yoshitomi y zorubicina.

Una cuarta familia de agentes antineoplásicos que puede usarse en combinación con los compuestos incluye una familia variada de agentes antineoplásicos seleccionados del grupo que consiste en alfa-caroteno, alfa-difluorometilarginina, acitretina, trióxido arsénico, Avastin® (bevacizumab), AD-5 de Biotec, AHC-52 de Kyorin, alstonina, amonafida, amfetinilo, amsacrina, Angiostat, ancincinomicina, antineoplaston A10, antineoplaston A2, antineoplaston A3, antineoplaston A5, antineoplaston AS2-1, APD de Henkel, glicinato de afidicolina, asparaginas, Avarol, bacarina, batracilina, benfluron, benzotript, BIM-23015 de Ipsen-Beaufour, bisantreno, BMY-40481 de Bristo-

Myers, boro-10 de Vestar, bromofosfamida, BW-502 de Wellcome, BW-773 de Wellcome, caracemida, clorhidrato de carmetizol, CDAF de Ajinomoto, clorosulfaquinoxalona, CHX-2053 de Chemes, CHX-100 de Chemex, CI-921 de Warner-Lambert, CI-937 de Warner-Lambert, CI-941 de Warner-Lambert, CI-958 de Warner-Lambert, clafenur, claviridena, compuesto 1259 de ICN, compuesto 4711 de ICN, Contracan, CPT-11 de Yakult Honsha, crisnatol, curaderm, citocalasina B, citarabina, citocitina, D-609 de Merz, maleato de DABIS, dacarbazina, dateliptinio, didemina-B, éter de dihematoporfirina, dihidrolenperona, dinalina, distamicina, Toyo Pharmar DM-341, Toyo DM-75 de Pharmar, DN-9693 de Daiichi Seiyaku, eliprabina, acetato de eliptinio, epotilonas, EPMTC de Tsumura, erbitux, ergotamina, erlotinib, etopósido, etretinato, fenretinida, FR-57704 de Fujisawa, nitrato de galio, genkwadaphnin, Gleevec® (imatnib), GLA-43 de Chugai, GR-63178 de Glaxo, gefitinib, grifolan NMF-5N, hexadecilfosfocolina, HO-221 de Green Cross, homoharringtonina, hidroxiourea, ICRF-187 de BTG, indanocina, ilmofosina, isoglutamina, isotretinoína, JI-36 de Otsuka, K-477 de Ramot, K-76COONa de Otsuak, K-AM de Kureha Chemical, KI-8110 de MECT Corp, L-623 de American Cyanamid, leucorregulina, lonidamina, LU-23-112 de Lundbeck, LY-186641 de Lilly, MAP de NCI (EE.UU.), maricina, mefloquina, MDL-27048 de Merrel Dow, MEDR-340 de Medco, merbarona, derivados de merocianina, metilaniilinoacridina, MGI-136 de Molecular Genetics, minactivina, mitonafida, mitoquidona, mopidamol, motretinida, MST-16 de Zenyaku Kogyo, N-(retinoil)aminoácidos, N-021 de Nissin Flour Milling, deshidroalaninas N-aciladas, nafazatrom, NCU-190 de Taisho, derivado de nocodazol, Normosang, NSC-145813 de NCI, NSC-361456 de NCI, NSC-604782 de NCI, NSC-95580 de NCI, octreotida, ONO-112 de Ono, oquizanocina, Org-10172 de Akzo, paclitaxel, pancratistatina, pazeliptina, PD-111707 de Warner-Lambert, PD-115934 de Warner-Lambert, PD-131141 de Warner-Lambert, PE-1001 de Pierre Fabre, péptido D de ICRT, piroxantrona, polihematoporfirina, ácido polipeico, porfirina de Efamol, probimano, procarbazona, proglumida, proteasa nexina I de Invitron, RA-700 de Tobishi, razoxano, RBS de Sapporo Breweries, restrictina-P, reteliptina, ácido retinoico, RP-49532 de Rhone-Poulenc, RP-56976 de Rhone-Poulenc, Rituxan® (y otros anticuerpos anti-CD20, por ejemplo, Bexxar®, Zevalin®), SK&F-104864 de SmithKline, estatinas (Lipitor® etc.), SM-108 de Sumitomo, SMANCS de Kuraray, SP-10094 de SeaPharm, espatol, derivados de espirociclopropano, espirogermanio, Unimed, SS-554 de SS Pharmaceutical, estripoldinona, estipoldiona, SUN 0237 de Suntory, SUN 2071 de Suntory, superóxido dismutasa, talidomida, análogos de talidomida, T-506 de Toyama, T-680 de Toyama, taxol, TEI-0303 de Teijin, tenipósido, taliblastina, TJB-29 de Eastman Kodak, tocotrienol, topostina, TT-82 de Teijin, UCN-01 de Kyowa Hakko, UCN-1028 de Kyowa Hakko, ucraina, USB-006 de Eastman Kodak, sulfato de vinblastina, vincristina, vindesina, vinestramida, vinorelbina, vintriptol, vinzolidina, con anolidas y YM-534 de Yamanouchi, Zometa®.

Ejemplos de agentes radioprotectores que pueden usarse en quimioterapia de combinación son AD-5, adcnona, análogos de amifostina, detox, dimesna, 1-102, MM-159, deshidroalaninas N-aciladas, TGF-Genentech, tiprotimod, amifostina, WR-151327, FUT-187, ketoprofeno transdérmico, nabumetona, superóxido dismutasa (Chiron y Enzon).

Procedimientos para la preparación de los agentes antineoplásicos descritos anteriormente pueden encontrarse en la bibliografía. Procedimientos para la preparación de doxorubicina, por ejemplo, se describen en las patentes de EE.UU. nº 3.590.028 y 4.012.448. Procedimientos para preparar inhibidores de proteasa de metalomatrix se describen en el documento EP 780386. Procedimientos para preparar inhibidores .alfa<sub>v</sub> .beta<sub>3</sub> se describen en el documento WO 97/08174.

Agentes antineoplásicos preferidos incluyen, sin limitación, uno o más de daunorubicina, bleomicina, vincristina, doxorubicina, dacarbazina, prednisolona, mitoxantrona, prednisona, metrotrexato, 5-fluorouracilo, dexametasona, talidomida, derivados de talidomida, 2ME2, Neovastat, R 11 5777, trióxido arsénico, bortezomib, tamoxifeno, G3139 (antisentido) y SU5416, mitomicina, anticuerpos anti-CD20 tales como Rituxan® y R-etodolac.

Pautas de fármacos preferidas para las que la presente formulación puede usarse conjuntamente con o como sustitución para uno o más de los componentes incluyen, sin limitación, ABVD (doxorubicina, bleomicina, vincristina, dacarbazina), DBV (daunorubicina, belomicina, vincristina), CVPP (ciclofosfamida, vinblastina, procarbazona, prednisolona), COP (ciclofosfamida, vincristina, prednisolona), CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) y CMF (ciclofosfamida, metrotrexato, 5-fluorouracilo). Pautas adicionales se facilitan en la siguiente Tabla A.

**Tabla A - Pautas terapéuticas contra el cáncer**

Abreviatura	Fármacos usado	Enfermedad
AC	Doxorubicina y ciclofosfamida	Cáncer de mama
CFM (CF, FNC)	Ciclofosfamida, fluorouracilo, mitoxantrona	Cáncer de mama
CMF	Ciclofosfamida, metrotrexato, fluorouracilo	Cáncer de mama
NFL	Mitoxantrona, fluorouracilo, leucovorina	Cáncer de mama
Dox-CMF secuencial	Doxorubicina	Cáncer de mama
VATH	Vinblastina, doxorubicina, tiotepa, fluoximesterona	Cáncer de mama
EMA-86	Etopósido, mitoxantrona, citarabina	LMA (inducción)
7+3	Citarabina CON daunorubicina o idarubicina o mitoxantrona	LMA (inducción)

Abreviatura	Fármacos usado	Enfermedad
5+2	Citarabina CON daunorubicina o mitoxantrona	LMA (inducción)
HiDAC	Citarabina	LMA (post-remisión)
ABVD	Doxorubicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina	Hodgkin
Ch1VPP	Clorambucilo, vinblastina, procarbazona, prednisona	Hodgkin
EVA	Etopósido, vinblastina, doxorubicina	Hodgkin
MOPP	Mecloretamina, vincristina, procarbazona, prednisona	Hodgkin
Híbrido de MOPP/ABV	Mecloretamina, vincristina, procarbazona, prednisona, doxorubicina, bleomicina, vinblastina	Hodgkin
MOPP/ABVD	Mecloretamina, doxorubicina, vinblastina, bleomicina, etopósido, prednisona	Hodgkin
CNOP	Ciclofosfamida, mitoxantrona, vincristina, prednisona	No Hodgkin
COMLA	Ciclofosfamida, vincristina, metotrexato, leucovorina, citarabina	No Hodgkin
DHAP	Dexametasona, cisplatino, citarabina	No Hodgkin
ESHAP	Etopósido, metilprednisolona, cisplatino, citarabina	No Hodgkin
MACOP-B	Metotrexato, leucovorina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina, septrá, ketoconazol	No Hodgkin
m-BACOD	Metotrexato, leucovorina, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona	No Hodgkin
MINE-ESHAF	Mesna, ifosfamida, mitoxantrona, etopósido	No Hodgkin
NOVP	Mitoxantrona, vinblastina, prednisona, vincristina	No Hodgkin
ProMACE/cytaBOM	Prednisona, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, citarabina, bleomicina, vincristina, metotrexato, leucovorina, septrá	No Hodgkin
M2	Vincristina, carmustina, ciclofosfamida, melfalan, prednisona	Mieloma múltiple
MP	Melfalan, prednisona	Mieloma múltiple
VAD	Vincristina, doxorubicina, dexametasona	Mieloma múltiple
VBMCP	Vincristina, carmustina, melfalan, ciclofosfamida, prednisona	Mieloma múltiple

Como se describe en el presente documento, una formulación liofilizada de bendamustina se consigue tras la eliminación de un disolvente orgánico en agua. El disolvente usado para preparar esta formulación es *terc*-butanol (TBA). Pueden usarse otros disolventes orgánicos que incluyen etanol, n-propanol, n-butanol, isopropanol, acetato de etilo, carbonato de dimetilo, acetonitrilo, diclorometano, metiletilcetona, metilisobutilcetona, acetona, 1-pentanol, acetato de metilo, metanol, tetracloruro de carbono, sulfóxido de dimetilo, hexafluoroacetona, clorobutanol, dimetilsulfona, ácido acético, ciclohexano. Estos disolventes precedentes pueden usarse en combinación con TBA. Disolventes útiles deben formar disoluciones estables con bendamustina y no deben degradar o desactivar apreciablemente el PAF. La solubilidad de bendamustina en el disolvente seleccionado debe ser suficientemente alta para formar concentraciones comercialmente útiles del fármaco en disolvente. Adicionalmente, el disolvente debe poder eliminarse fácilmente de una dispersión o disolución acuosa del producto terminado, por ejemplo, mediante liofilización o secado a vacío. Preferentemente se usa una disolución que tiene una concentración de aproximadamente 2-80 mg/ml, preferentemente aproximadamente 5 a 40 mg/ml, más preferentemente 5-20 mg/ml e incluso más preferentemente 12 a 17 mg/ml de bendamustina.

Un excipiente de liofilización farmacéuticamente aceptable puede disolverse en la fase acuosa. Ejemplos de excipientes útiles para la presente invención incluyen, sin limitación, fosfato de sodio o potasio, ácido cítrico, ácido tartárico, gelatina, glicina e hidratos de carbono tales como lactosa, sacarosa, maltosa, glicerina, dextrosa, dextrano, trehalosa y hetastarch. El manitol es un excipiente preferido. Otros excipientes que pueden usarse, si se desea, incluyen antioxidantes tales como, sin limitación, ácido ascórbico, acetilcisteína, cisteína, hidrogenosulfito de sodio, butil-hidroxianisol, butil-hidroxitolueno o acetato de alfa-tocoferol, o quelantes.

A continuación se proporciona una formulación típica y ciclo de liofilización útil según la presente invención. La liofilización puede llevarse a cabo usando equipo convencional como se usa para la liofilización o secado a vacío. El ciclo puede variarse dependiendo del equipo e instalaciones usadas para el llenado/acabado.

Según una realización típica de la presente invención, una disolución o dispersión acuosa de pre-liofilización se formula primero en un recipiente de combinación farmacéuticamente aceptable. La disolución se filtra asépticamente en un recipiente estéril, se envasa en un vial de tamaño apropiado, se tapa parcialmente y se carga en un liofilizador. Usando técnicas de liofilización descritas en el presente documento, la disolución se liofiliza hasta que se alcanza un contenido de humedad en el intervalo de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 8,0 por ciento. El polvo de liofilización resultante es estable como un polvo liofilizado durante aproximadamente seis meses a más de aproximadamente 2 años, preferentemente más de aproximadamente 3 años a aproximadamente 5°C a aproximadamente 25° C y puede reconstituirse fácilmente con agua estéril para inyección, u otro vehículo adecuado, para proporcionar formulaciones líquidas de bendamustina, adecuadas para administración interna, por ejemplo, mediante inyección parenteral. Para administración intravenosa, la formulación líquida reconstituida, es decir, la composición farmacéutica, es preferentemente una disolución.

La disolución o dispersión de pre-liofilización normalmente se formula primero en un recipiente farmacéuticamente aceptable: 1) añadiendo un excipiente, tal como manitol (aproximadamente 0 a aproximadamente 50 mg/ml) mezclando en agua (aproximadamente el 65% del volumen total) a temperatura ambiente, 2) añadiendo un disolvente orgánico (0,5 - 99,9% v/v) tal como TBA a la disolución acuosa mezclando a aproximadamente 20°-35°C, 4) añadiendo HCl de bendamustina a la concentración deseada con mezcla, 5) añadiendo agua para lograr el volumen final, y 6) enfriando la disolución a aproximadamente 1°C a aproximadamente 30°C, preferentemente aproximadamente 5°C. Aunque las etapas precedentes se muestran en un cierto orden, se entiende que un experto en la materia puede cambiar el orden de las etapas y cantidades según se necesite. También pueden prepararse cantidades en una base en peso.

La disolución o dispersión de pre-liofilización puede esterilizarse antes de la liofilización, la esterilización se realiza generalmente por filtración aséptica, por ejemplo, a través de un filtro de 0,22 micrómetros o menos. Pueden usarse múltiples filtros de esterilización. La esterilización de la disolución o dispersión puede lograrse por otros procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, radiación.

En este caso, después de la esterilización, la disolución o dispersión está lista para la liofilización. Generalmente, la disolución filtrada se introducirá en un recipiente receptor estéril, y luego se transferirá a cualquier recipiente o recipientes adecuados en los que la formulación pueda liofilizarse eficazmente. Normalmente, la formulación es eficazmente y eficientemente liofilizada en los recipientes en los que el producto va a comercializarse tal como, sin limitación, un vial, como se describe en el presente documento y como se conoce en la técnica.

Un procedimiento típico para su uso en liofilizar las disoluciones o dispersiones de pre-liofilización se expone a continuación. Sin embargo, un experto en la materia entendería que las modificaciones al procedimiento o proceso pueden hacerse dependiendo de cosas tales como, pero no se limitan a, la disolución o dispersión de pre-liofilización y el equipo de liofilización.

Inicialmente, el producto se dispone en una cámara de liofilización bajo un intervalo de temperaturas y entonces se somete a temperaturas muy por debajo del punto de congelación del producto, generalmente durante varias horas. Preferentemente, la temperatura será o estará por debajo de aproximadamente -40°C durante al menos 2 horas. Después de completarse la congelación, la cámara y el condensador se evacúan mediante bombas de vacío, habiendo sido previamente enfriada la superficie del condensador por refrigerante en circulación. Preferentemente, el condensador habrá sido enfriado por debajo del punto de congelación de la disolución, preferentemente a aproximadamente -40°, más preferentemente a aproximadamente -50°C o menor, incluso más preferentemente a aproximadamente -60°C o menor. Adicionalmente, la evacuación de la cámara debe continuar hasta que se obtiene una presión de aproximadamente 10 a aproximadamente 600 micrómetros, preferentemente aproximadamente 50 a aproximadamente 150 micrómetros.

La composición de producto se calienta entonces a vacío en la cámara y el condensador. Esto se llevará normalmente a cabo calentando las bandejas dentro del liofilizador sobre el que el producto descansa durante el procesamiento de liofilización a una presión que oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 600 micrómetros. El procedimiento de calentamiento tendrá óptimamente lugar muy gradualmente, durante el transcurso de varias horas. Por ejemplo, la temperatura del producto debe aumentarse inicialmente de aproximadamente -30°C a aproximadamente -10°C y mantenerse durante aproximadamente 10-70 horas. Adicionalmente, la temperatura del producto puede aumentarse de la temperatura de congelación a aproximadamente 25°C-40°C durante un periodo de 30-192 horas. Para prevenir la expulsión de polvo del liofilizado de viales, la eliminación completa del disolvente orgánico y agua debe hacerse durante la fase de secado inicial. El secado completo puede confirmarse por estabilización del vacío, temperatura del condensador y temperatura de las bandejas de producto. Después del secado inicial, la temperatura del producto debe aumentarse a aproximadamente 25°C-40°C y mantenerse durante aproximadamente 5-40 horas.

Una vez se ha completado el ciclo de secado, la presión en la cámara puede liberarse lentamente hasta la presión atmosférica (o ligeramente por debajo) con gas nitrógeno seco estéril (o gas equivalente). Si la composición de producto se ha liofilizado en recipientes tales como viales, los viales pueden taparse, sacarse y sellarse. Pueden sacarse varias muestras representativas para los fines de realización de diversas pruebas físicas, químicas y microbiológicas para analizar la calidad del producto.

La formulación de bendamustina liofilizada se comercializa normalmente en forma de dosificación farmacéutica. La forma de dosificación farmacéutica de la presente invención, aunque normalmente en forma de un vial, puede ser cualquier recipiente adecuado, tal como ampollas, jeringuillas, co-viales, que pueden mantener un entorno estéril. Tales recipientes pueden ser vidrio o plástico, a condición de que el material no interaccione con la formulación de bendamustina. El cierre es normalmente un tapón, lo más normalmente un tapón de goma estéril, preferentemente un tapón de goma de bromobutilo, que proporciona un cierre hermético.

Después de la liofilización, el polvo de liofilización de bendamustina puede envasarse en recipientes tales como viales, o alternativamente la disolución de pre-liofilización puede envasarse en tales viales y liofilizarse en su interior, produciendo viales que contienen directamente la formulación de bendamustina liofilizada. Tales viales se sellan,

después del envasado o liofilización de la disolución en su interior, como con un tapón, para proporcionar una forma de dosificación farmacéutica estéril sellada. Normalmente, un vial contendrá un polvo liofilizado que incluye aproximadamente 10-500 mg/vial, preferentemente aproximadamente 100 mg/vial, de bendamustina y aproximadamente 5 mg-2 g/vial, preferentemente aproximadamente 170 mg/vial, de manitol.

Las formulaciones liofilizadas pueden reconstituirse con agua, preferentemente agua estéril para inyección, u otro fluido estéril tal como co-disolventes, para proporcionar una disolución de bendamustina apropiada para administración, como por inyección parenteral tras la dilución adicional en un recipiente de mezcla intravenosa apropiado, por ejemplo, solución salina normal.

B. Solubilidad

La solubilidad de HCl de bendamustina (bendamustina) en agua (sola) y con cantidades variables de alcoholes comúnmente usados en liofilización, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol y alcohol *terc*-butílico (TBA) se determinó por inspección visual. Cantidades de bendamustina a 15 mg/ml, combinada con manitol a 25,5 mg/ml, se prepararon en 10 ml de las disoluciones de alcohol indicadas a temperatura ambiente (véase la Tabla 1). Entonces, las muestras se refrigeraron a 5°C y se inspeccionaron después de 0, 3, 6 y 24 horas para partículas y/o precipitados.

Los resultados mostrados en la Tabla 1 indican que la solubilidad de bendamustina depende de la temperatura y la cantidad de alcohol en disoluciones acuosas. Para los alcoholes probados, la solubilidad de bendamustina aumentó a medida que aumentó la concentración de alcohol. La formación de un precipitado también dependió de la temperatura y el tiempo. La bendamustina no precipitó inmediatamente con ningún alcohol, pero cristalizó después del almacenamiento a 5°C. Los alcoholes variaron en su efecto sobre la solubilidad. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, alcoholes más pequeños tales como metanol y etanol tienen menos efecto sobre la solubilidad en comparación con alcoholes mayores (*terc*-butanol y n-butanol). Sin embargo, la forma del alcohol también es importante. Por ejemplo, se encontró que el n-propanol era mejor que el iso-propanol en prevenir la precipitación en este sistema. Los dos alcoholes con el mayor efecto sobre solubilidad fueron n-propanol y *terc*-butanol.

Tabla 1. Solubilidad de bendamustina durante un periodo de 24 horas en diversos alcoholes cuando se almacenó a 5°C.

	Tiempo cero	3 horas	6 horas	24 horas
Metanol (v/v)				
0% (Agua sola)	DCC	DCC	Precipitado	Precipitado
5%	DCC	DCC	Precipitado	Precipitado
10%	DCC	DCC	DCC	Precipitado
20%	DCC	DCC	DCC	Precipitado
30%	DCC	DCC	DCC	DCC
Etanol (v/v)				
1,9%	DCC	DCC	Precipitado	Precipitado
5%	DCC	DCC	Precipitado	Precipitado
10%	DCC	DCC	DCC	Precipitado
20%	DCC	DCC	DCC	DCC
30%	DCC	DCC	DCC	DCC
n-Propanol (v/v)				
5%	DCC	DCC	DCC	Precipitado
10%	DCC	DCC	DCC	DCC
20%	DCC	DCC	DCC	DCC
30%	DCC	DCC	DCC	DCC
Iso-propanol (v/v)				
5%	DCC	Precipitado	Precipitado	Precipitado
10%	DCC	DCC	DCC	DCC
20%	DCC	DCC	DCC	DCC
30%	DCC	DCC	DCC	DCC
n-Butanol (v/v)				
5%	DCC	DCC	DCC	DCC
10%	DCC	DCC	DCC	DCC
20%	2 capas	2 capas	2 capas	2 capas
30%	2 capas	2 capas	2 capas	2 capas
<i>Terc</i> -butanol (v/v)				
5%	DCC	DCC	DCC	Precipitado
10%	DCC	DCC	DCC	Precipitado
20%	DCC	DCC	DCC	DCC

	Tiempo cero	3 horas	6 horas	24 horas
30%	DCC	DCC	DCC	DCC

DCC representa disolución de color claro

Los experimentos para determinar cuantitativamente la solubilidad de bendamustina a diversas temperaturas para tres disoluciones diferentes se resumen en la Figura 1 y la Tabla 2. La cantidad de TBA, 20% (v/v) y 30% (v/v), usada en el experimento se basó en estudios de estabilidad (resultados descritos más adelante). Para ambas disoluciones probadas, la solubilidad de bendamustina disminuyó linealmente con temperaturas de 25°C a 0°C. Este experimento confirmó los datos mostrados en la Tabla 1 y resalta la diferencia en la solubilidad de bendamustina para disoluciones al 20% y 30% de TBA.

Tabla 2. Solubilidad de bendamustina en TBA

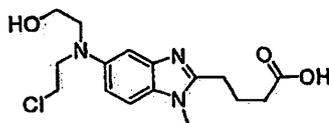
	-8°C	0°C	5°C	25°C
20% (v/v) de TBA 25,5 mg/ml de manitol Agua, c.s.p. hasta el volumen deseado	14 mg/ml	11 mg/ml	17 mg/ml	47 mg/ml
30% (v/v) de TBA 25,5 mg/ml de manitol Agua, c.s.p. hasta el volumen deseado	20 mg/ml	18 mg/ml	27 mg/ml	65 mg/ml

### C. Estabilidad

Debido a su inestabilidad en disoluciones acuosas debido a la hidrólisis con agua, la bendamustina requiere liofilización con el fin de preparar un producto adecuado para uso farmacéutico. Sin embargo, durante la fabricación de productos terminados liofilizados, comúnmente se necesitan disoluciones acuosas para el envasado, antes de la liofilización. Por tanto, el uso de disoluciones acuosas durante los procedimientos de combinación y envasado para bendamustina y otras mostazas de nitrógeno puede producir degradación del producto terminado. Por consiguiente, el efecto de diversos alcoholes sobre la degradación de la bendamustina se evaluó para determinar si podrían encontrarse formulaciones que permitieran tiempos de envasado-acabado prolongados, proporcionarían polvos de liofilizado que pudieran reconstituirse más rápidamente que la presente formulación de Ribomustin® y/o proporcionarían preparaciones liofilizadas de bendamustina con un mejor perfil de impurezas con respecto a ciertas impurezas, por ejemplo, HP1 y dímero de BM1 que Ribomustin®.

Preferentemente, una preparación liofilizada es estable con respecto a HP1, es decir, la cantidad de HP1 no aumenta apreciablemente (no supera las especificaciones de estabilidad en almacén), durante 6 meses, más preferentemente 12 meses, e incluso más preferentemente más de 24 meses, por ejemplo, 36 meses, cuando se almacena a aproximadamente 2°C a aproximadamente 30°C, preferentemente 5°C.

La Tabla 3 muestra los resultados de estabilidad de bendamustina en agua sin adición de alcohol durante un periodo de 24 horas a 5°C. La bendamustina se degrada rápidamente en agua sola y forma predominantemente el producto de hidrólisis, HP1 (monohidroxibendamustina).

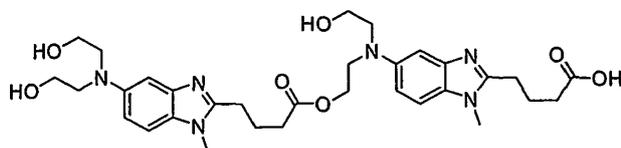


**Monohidroxibendamustina (HP1)**  
**Fórmula II**

Tabla 3. Estabilidad de bendamustina en agua

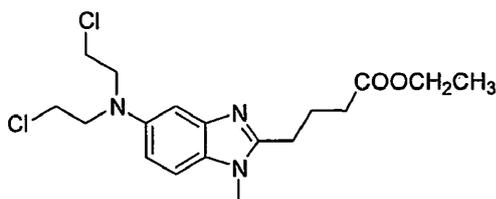
	Tiempo de mantenimiento	Pureza (% del área)	HP1 (%)	Dímero (%)
0% de alcohol, es decir, agua sola	0 horas	99,11	0,60	0,11
	3 horas	98,83	0,86	0,13
	6 horas	98,44	1,22	0,17
	24 horas	95,67	3,81	0,29

El otro degradante importante observado durante este estudio y otros estudios de estabilidad a largo plazo fue el dímero de bendamustina.

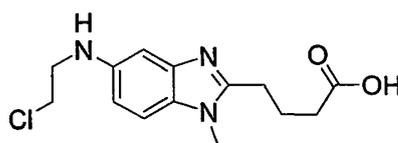


**Dímero de bendamustina (dímero de BM1)**  
**Fórmula III**

Otros degradantes contenidos en el producto liofilizado Ribomustin son éster etílico de bendamustina (BM1EE) (Fórmula IV) y BM1DCE (Fórmula V). BM1EE se forma cuando la bendamustina reacciona con alcohol etílico.



**Éster etílico de bendamustina (BM1EE)**  
**(Fórmula IV)**



**BM1DCE**  
**Formula V**

La Figura 2 resume los resultados de pureza de un análisis de HPLC después de incubar bendamustina en diversos alcoholes durante 24 horas a 5°C. Los resultados se presentan como el porcentaje en área del área de pico total. Los valores numéricos para la Figura 2 se proporcionan en las Tablas 3-9. La pureza fue la mayor en disoluciones que contienen mayor concentración de alcoholes, independientemente del alcohol. De los alcoholes evaluados, la bendamustina se degradó menos en una disolución que contiene aproximadamente 30% (v/v) de TBA. En disoluciones a aproximadamente el 10% y aproximadamente el 20% de alcohol, el n-butanol fue superior en prevenir la degradación de bendamustina. A 20% y 30% (v/v), n-butanol en agua produjo un sistema bifásico debido a la insolubilidad del n-butanol en agua a estas concentraciones.

Las Figuras 3 y 4 muestran la cantidad de degradación de bendamustina como se mide por la formación de HP1 y de dímero cuantificada por HPLC (como se describe en el presente documento). La formación de HP1 y de dímero aumentó a medida que disminuyó la cantidad de concentración de alcohol independientemente del alcohol. Este aumento en las impurezas se produjo con una dependencia del tiempo anticipado (véanse las Tablas 3-9). *Terc*-butanol y n-butanol parecieron superiores a otros alcoholes en prevenir la degradación del producto. Como se observa en la Tabla 10, el manitol no tuvo efecto sobre la estabilización de la bendamustina con TBA.

Tabla 4. Resultados de estabilidad por HPLC para la estabilidad de bendamustina en diversas concentraciones de alcohol etílico durante un periodo de 24 horas. HP1 y el dímero fueron impurezas que aumentaron en este estudio.

V/V de alcohol	Tiempo de mantenimiento	Pureza (% de área)	HP1 (%)	Dímero (%)
1,9% de etanol	0 horas	99,11	0,64	0,12
	3 horas	98,83	0,90	0,14
	6 horas	98,60	1,12	0,15
	24 horas	96,16	3,41	0,27
5% de etanol	0 horas	99,31	0,44	0,12
	3 horas	99,10	0,64	0,13
	6 horas	98,87	0,86	0,14
	24 horas	96,89	2,68	0,25
10% de etanol	0 horas	99,44	0,33	0,11
	3 horas	99,28	0,48	0,12

V/V de alcohol	Tiempo de mantenimiento	Pureza (% de área)	HP1 (%)	Dímero (%)
	6 horas	99,10	0,65	0,12
	24 horas	98,03	1,57	0,18
20% de etanol	0 horas	99,54	0,22	0,10
	3 horas	99,45	0,30	0,11
	6 horas	99,36	0,39	0,11
	24 horas	98,61	0,96	0,15
30% de etanol	0 horas	99,62	0,15	0,10
	3 horas	99,56	0,21	0,11
	6 horas	99,52	0,24	0,12
	24 horas	99,21	0,45	0,12

Tabla 5. Resultados de estabilidad por HPLC para bendamustina en diversas concentraciones de *terc*-butanol durante un periodo de 24 horas. HP1 y el dímero fueron impurezas que aumentaron en este estudio

Concentración de alcohol (v/v)	Tiempo de mantenimiento	Pureza (% de área)	HP1 (%)	Dímero (%)
5% de <i>terc</i> -butanol	0 horas	99,34	0,41	0,12
	3 horas	99,10	0,64	0,14
	6 horas	98,85	0,88	0,13
	24 horas	97,58	2,09	0,20
10% de <i>terc</i> -butanol	0 horas	99,46	0,30	0,11
	3 horas	99,26	0,48	0,12
	6 horas	99,05	0,69	0,13
	24 horas	98,04	1,64	0,19
20% de <i>terc</i> -butanol	0 horas	99,59	0,17	0,11
	3 horas	99,48	0,29	0,11
	6 horas	99,35	0,40	0,12
	24 horas	98,35	1,27	0,20
30% de <i>terc</i> -butanol	0 horas	99,63	0,13	0,10
	3 horas	99,60	0,16	0,10
	6 horas	99,58	0,18	0,11
	24 horas	99,42	0,34	0,12

5

Tabla 6. Resultados de estabilidad por HPLC para diversas concentraciones de alcohol n-propílico durante un periodo de 24 horas. HP1 y el dímero fueron impurezas que aumentaron en este estudio.

Concentración de alcohol (v/v)	Tiempo de mantenimiento	Pureza (% de área)	HP1 (%)	Dímero (%)
5% de n-propanol	0 horas	99,25	0,43	0,13
	3 horas	99,00	0,66	0,15
	6 horas	98,72	0,94	0,16
	24 horas	97,24	2,33	0,26
10% de n-propanol	0 horas	99,34	0,33	0,15
	3 horas	99,17	0,48	0,14
	6 horas	98,92	0,70	0,16
	24 horas	97,67	1,83	0,28
20% de n-propanol	0 horas	99,45	0,33	0,13
	3 horas	99,42	0,26	0,13
	6 horas	99,29	0,39	0,14
	24 horas	98,60	0,97	0,24
30% de n-propanol	0 horas	99,53	0,15	0,13
	3 horas	99,51	0,15	0,15
	6 horas	99,44	0,20	0,11
	24 horas	99,27	0,36	0,17

10

Tabla 7. Resultados de estabilidad por HPLC para bendamustina en diversas concentraciones de alcohol iso-propílico durante un periodo de 24 horas. HP1 y el dímero fueron impurezas que aumentaron en este estudio.

Concentración de alcohol (v/v)	Tiempo de mantenimiento	Pureza (% de área)	HP1 (%)	Dímero (%)
5% de iso-propanol	0 horas	99,21	0,48	0,13
	3 horas	98,65	0,72	0,14
	6 horas	98,56	1,02	0,14
	24 horas	96,14	3,35	0,26
10% de iso-propanol	0 horas	99,32	0,37	0,12

	3 horas	99,11	0,55	0,14
	6 horas	98,85	0,75	0,16
	24 horas	97,68	1,92	0,21
20% de iso-propanol	0 horas	99,49	0,21	0,11
	3 horas	99,39	0,31	0,12
	6 horas	99,22	0,42	0,13
	24 horas	98,61	1,04	0,17
30% de iso-propanol	0 horas	99,56	0,15	0,10
	3 horas	99,47	0,20	0,12
	6 horas	99,40	0,24	0,11
	24 horas	99,15	0,52	0,14

Tabla 8. Resultados de estabilidad por HPLC para bendamustina en diversas concentraciones de alcohol metílico durante un periodo de 24 horas. HP1 y el dímero fueron impurezas que aumentaron en este estudio.

Concentración de alcohol (v/v)	Tiempo de mantenimiento	Pureza (% de área)	HP1 (%)	Dímero (%)
5% de metanol	0 horas	99,35	0,40	0,12
	3 horas	98,97	0,70	0,14
	6 horas	98,66	0,95	0,14
	24 horas	96,65	2,83	0,23
10% de metanol	0 horas	99,42	0,34	0,11
	3 horas	99,01	0,59	0,12
	6 horas	98,86	0,80	0,12
	24 horas	97,65	1,85	0,18
20% de metanol	0 horas	99,56	0,22	0,11
	3 horas	99,31	0,38	0,11
	6 horas	98,99	0,50	0,12
	24 horas	98,31	1,15	0,16
30% de metanol	0 horas	99,59	0,18	0,10
	3 horas	99,43	0,27	0,11
	6 horas	99,25	0,34	0,11
	24 horas	98,65	0,76	0,13

5

Tabla 9. Resultados de estabilidad por HPLC para bendamustina en diversas concentraciones de alcohol n-butílico durante un periodo de 24 horas. HP1 y el dímero fueron impurezas que aumentaron en este estudio.

Concentración de alcohol (v/v)	Tiempo de mantenimiento	Pureza (% de área)	HP1 (%)	Dímero (%)
5% de butanol	0 horas	99,25	0,49	0,13
	3 horas	98,94	0,73	0,14
	6 horas	98,76	0,91	0,14
	24 horas	97,46	2,20	0,21
10% de butanol	0 horas	99,44	0,30	0,11
	3 horas	99,18	0,49	0,12
	6 horas	99,03	0,64	0,12
	24 horas	98,13	1,55	0,17
20% de butanol <sup>a</sup>	0 horas	99,54	0,23	0,10
	3 horas	99,45	0,31	0,11
	6 horas	99,30	0,40	0,11
	24 horas	98,81	0,91	0,14
30% de butanol <sup>a</sup>	0 horas	99,55	0,24	0,10
	3 horas	99,40	0,29	0,10
	6 horas	99,40	0,37	0,11
	24 horas	99,00	0,74	0,12

a - Ambas disoluciones tuvieron 2 capas/fases de líquidos en el vial. Las disoluciones se agitaron con vórtex antes de la preparación de las muestras.

10 Los resultados en las Tablas 1-9 indican que la estabilidad de HCl de bendamustina con respecto a HP1 y dímero mejora con concentración de alcohol creciente.

Tabla 10. Resultados de estabilidad por HPLC para bendamustina en TBA con y sin manitol durante un periodo de 24 horas.

Muestra	Pureza (% de área)	HP1 (%)
TBA 20% (v/v) con manitol		
0 horas	99,59	0,17
24 horas a 5°C	99,35	1,27
TBA 20% (v/v) sin manitol		
0 horas	100,0	0,00
24 horas a 5°C	98,80	1,21
NOTA: Las muestras analizadas sin manitol se analizaron por HPLC usando un procedimiento de fase normal mientras que las muestras analizadas con manitol usaron un procedimiento de HPLC de fase inversa. Puede observarse una ligera variabilidad en otras muestras analizadas entre los dos procedimientos.		

5 D. Desarrollo del ciclo de liofilización

Se prepararon diferentes formulaciones de pre-liofilización a diversas concentraciones de bendamustina, manitol y alcoholes en agua. El desarrollo del ciclo se cambió y se optimizó en cada etapa para la congelación (rápida frente a lenta), secado primario (tanto temperatura como presión) y secado secundario como se ha descrito en el presente documento.

10

Basándose en toda la información detallada anteriormente sobre la solubilidad, estabilidad y facilidad de liofilización, las formulaciones preferidas incluyen las siguientes:

Componentes	Concentración
Bendamustina	aproximadamente 5-20 mg/ml
Manitol	10-30 mg/ml
Alcohol	5-40% (v/v)
Agua, c.s.p. hasta	volumen deseado
Componentes	Concentración
HCl de bendamustina	aproximadamente 12-17 mg/ml
Manitol	aproximadamente 20-30 mg/ml
Alcohol	aproximadamente 5-15% (v/v)
Agua, c.s.p. hasta	volumen deseado
Componentes	Concentración
HCl de bendamustina	aproximadamente 2-50 mg/ml
Manitol	aproximadamente 0-50 mg/ml
Terc-butanol	aproximadamente 0,5-99,9% (v/v)
Agua, c.s.p. hasta	volumen deseado
Componentes	Concentración
HCl de bendamustina	aproximadamente 2-50 mg/ml
Manitol	aproximadamente 0-50 mg/ml
Terc-butanol	aproximadamente 90-99% (v/v)
Agua, c.s.p. hasta	volumen deseado
Componentes	Concentración
HCl de bendamustina	aproximadamente 5-20 mg/ml
Manitol	aproximadamente 10-30 mg/ml
Terc-butanol	aproximadamente 5-80% (v/v)
Agua, c.s.p. hasta	volumen deseado
Componentes	Concentración
HCl de bendamustina	aproximadamente 12-17 mg/ml
Manitol	aproximadamente 20-30 mg/ml
Terc-butanol	aproximadamente 10-50% (v/v)
Agua, c.s.p. hasta	volumen deseado

## ES 2 405 611 T3

Componente	Concentración
HCl de bendamustina	aproximadamente 15 mg/ml
Manitol	aproximadamente 25,5 mg/ml
<i>Terc</i> -butanol	aproximadamente 30% (v/v)
Agua, c.s.p. hasta	volumen deseado

### EJEMPLOS

- 5 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertos aspectos de la presente invención y para ayudar a aquellos expertos en la materia en la puesta en práctica de la invención. Estos ejemplos no deben considerarse de ninguna forma que limitan de alguna forma el alcance de la invención.

#### Materiales:

- 10 HCl de bendamustina (Degussa, lotes nº 0206005 y 0206007)  
Manitol, NF o equivalente (Mallinckrodt)  
Alcohol etílico deshidratado (alcohol puro), USP o equivalente (Spectrum)  
Alcohol *terc*-butílico, ACS (EM Science)  
Metanol (Spectrum y EMD)
- 15 Propanol (Spectrum)  
Iso-propanol (Spectrum)  
Butanol (Spectrum)  
Agua, calidad para HPLC o equivalente (EMD)  
Acetonitrilo, calidad para HPLC o equivalente (EMD)
- 20 Ácido trifluoroacético, J.T. Baker  
Metanol, calidad para HPLC o equivalente (EM Science, nº de cat MX0488P-1)  
Ácido trifluoroacético, calidad para HPLC o equivalente (JT Baker, nº de cat JT9470-01)

#### Equipo:

- 25 Sistema de HPLC Waters 2695 Alliance con detector de matriz de fotiododo  
Sistema de HPLC Waters 2795 Alliance con detector de longitud de onda dual  
Balanza analítica (Mettler AG285, nº ID 1028) y (Mettler XS205)  
Liofilizador VirTis AdVantage
- 30 Columna Agilent Zorbax SB-C18 5 µm 80 Å 4,6 × 250 mm, nº de cat 880975-902

#### Ejemplo 1 - Procedimientos de HPLC

##### *Procedimiento 1*

- 35 Fase móvil A: 0,1% de TFA; H<sub>2</sub>O  
Fase móvil B: 0,1% de TFA; 50% de ACN:50% de H<sub>2</sub>O  
UV: 230 nm  
Velocidad de flujo: 1,0 ml/min  
Temp. de la columna: 30°C  
Columna: Zorbax SB-C18 5 µm 80 Å 4,6 × 250 mm  
Temp. de la muestra: 5°C  
Volumen de inyección: 10 µl  
Concentración de muestra: 0,25 mg/ml en MeOH  
Gradiente: 20% de B durante 1 min  
20 - 90% de B en 23 min  
90% de B durante 6 min  
vuelta al 20% de B en 1 min  
mantenimiento en 20% de B durante 4 min
- Tiempo de ejecución: 30 min  
Tiempo post-ejecución: 5 min

##### *Procedimiento 2*

- Fase móvil A: 0,1% de TFA; H<sub>2</sub>O:ACN (9:1)  
Fase móvil B: 0,1% de TFA; H<sub>2</sub>O:ACN (5:5)  
UV: 230 nm  
Velocidad de flujo: 1,0 ml/min  
Columna: Zorbax SB-C18 5 µm 80 Å 4,6 × 250 mm  
Temp. de la columna: 30°C  
Temp. de la muestra: 5°C

## ES 2 405 611 T3

Volumen de inyección: 10 µl  
 Concentración de muestra: 0,25 mg/ml en MeOH  
 Gradiente: 0% de B durante 3 min  
 0- 50% de B en 13 min  
 50 - 70% de B en 17 min  
 70 - 90% de B en 2 min  
 90% de B durante 5 min  
 vuelta al 0% de B en 1 min  
 mantenimiento en 0% de B durante 4 min  
 Tiempo de ejecución: 40 min  
 Tiempo post-ejecución: 5 min

### **Procedimiento 3**

Fase A: Agua de calidad para HPLC con 0,1% de TFA (v/v)  
 Fase B: ACN/agua de calidad para HPLC (1:1 v/v) con 0,1% de TFA (v/v)  
 UV: 254 nm  
 Velocidad de flujo: 1,0 ml/min  
 Columna: Zorbax SB-C18 5 µm 80 Å 4,6 × 250 mm  
 Temp. de la columna: 30°C  
 Temp. de la muestra: 5°C  
 Volumen de inyección: 5 µl  
 Tiempo de adquisición: 30 min  
 Post-tiempo: 9 min  
 Diluyente: metanol

5 Gradiente:

Tiempo (min)	% de fase A	% de fase B
0,0	82	18
7,0	60	40
11,0	60	40
15,0	20	80
30,0	20	80
31,0	82	18

Preparación de muestras – disolver el producto terminado con 200 ml de MeOH. Sonicar 6 minutos. La disolución puede inyectarse directamente en la HPLC (aprox. 0,5 mg/ml)

10

### *Procedimiento 4*

Fase A: Agua de calidad para HPLC con 0,1% de TFA (v/v)  
 Fase B: ACN de calidad para HPLC con 0,1% de TFA (v/v)  
 UV: 254 nm  
 Velocidad de flujo: 1,0 ml/min  
 Columna: Zorbax Bonus RP-C14 5 µm 4,6 × 150 mm  
 Temp. de la columna: 30°C  
 Temp. de la muestra: 5°C  
 Volumen de inyección: 2 µl  
 Tiempo de adquisición: 31 min  
 Post-tiempo: 5 min  
 Diluyente: NMP/0,1% de TFA en agua (50:50 v/v)

25 Gradiente:

Tiempo (min)	% de fase A	% de fase B
0,0	93	7
5	93	7
13	73	27
16	73	27
25	10	90
31	10	90

Preparación de muestras para el procedimiento 4 - disolver el producto terminado con una cantidad conocida de

diluyente para preparar una concentración de 4,2 mg/ml para inyección directamente en la HPLC. Puede ser necesario realizar una segunda dilución (forma de dosificación de 100 mg/vial) para obtener una concentración de muestra de 4,2 mg/ml .

5 **Resultados**

Los tiempos de retención para algunas impurezas de bendamustina usando el procedimiento de HPLC 1 descrito anteriormente se muestran en la Tabla 11. Un cromatógrafo de HPLC para Ribomustin® usando el procedimiento de HPLC descrito en el presente documento se muestra en la Fig. 6.

10

Tabla 11: Tiempo de retención para bendamustina y algunas de sus impurezas usando el procedimiento de HPLC 1

Nombre de la muestra	Tiempo de retención (min)
HP1	14,110
Bendamustina	22,182
Dímero de BM1	24,824
BM1EE	26,968

15

Aunque el procedimiento de HPLC 1 pudo resolver impurezas encontradas en bendamustina, no pudo separar una posible impureza formada durante el análisis, el éster metílico de bendamustina (BM1ME). La diferencia del tiempo de retención entre BM1ME y el dímero de BM1 fue sólo 0,3 minutos. Con el fin de resolver el dímero de BM1 se desarrolló otro procedimiento de HPLC (nº 2). El procedimiento de HPLC nº 2 pudo separar todas las impurezas, pero requirió un tiempo de ejecución más largo de 45 minutos (Tabla 12).

20

Tabla 12: Tiempo de retención para bendamustina e impurezas usando el procedimiento de HPLC 2.

Nombre de la muestra	Tiempo de retención (min)
HP1	15,694
BM1	25,420
BM1ME	31,065
Dímero de BM1	32,467
BM1EE	36,038

25

El perfil de impurezas de diversos lotes de Ribomustin usando el procedimiento de HPLC 3 se muestra en la Tabla 13.

Tabla13: Perfil de impurezas de Ribomustin usando el procedimiento de HPLC 3

Lote	% de área				
	Bendamustina (HCl)	HP1	BM1EE	Dímero de BM1	BM1DCE
03H08	98,14	1,07	0,21	0,34	0,03
03H07	97,67	1,5	0,2	0,33	0,04
02K27	96,93	0,93	0,29	1,18	0,08
03C08	97,61	1,24	0,19	0,46	0,02

30

**Ejemplo 2 - Solubilidad**

35

La solubilidad de HCl de bendamustina (bendamustina) en agua (sola) y con cantidades variables de metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol y alcohol *terc*-butílico (TBA) se determinó por inspección visual. Las cantidades de bendamustina a 15 mg/ml, manitol a 25,5 mg/ml se prepararon en 10 ml de las disoluciones de alcohol indicadas (Tabla 1) a temperatura ambiente. Entonces, las muestras se refrigeraron a 5°C y se inspeccionaron después de 0, 3, 6 y 24 horas para partículas y/o precipitados.

40

Los resultados resumidos en la Tabla 1 indican que la solubilidad de bendamustina depende de la temperatura y la cantidad de alcohol en disoluciones acuosas. Para todos los alcoholes la solubilidad de bendamustina aumentó a medida que aumentó la concentración de alcohol. La formación de un precipitante también dependió de la temperatura y el tiempo.

45

La solubilidad de bendamustina también se determinó en 20% (v/v) de TBA que contenía 25,5 mg/ml de manitol en agua, y 30% (v/v) de TBA que contenía 25,5 mg/ml de manitol en agua (Fig. 1). La bendamustina se añadió a 4 ml de cada disolución mientras que se agitaba hasta que ya no se disolvió. Se dejó que las disoluciones saturadas se mezclaran durante 1 hora a -8°C, 0°C, 5°C o 25°C. Las muestras se centrifugaron y se llevaron de nuevo a la temperatura original durante un mínimo de 30 minutos. La muestra a -8°C se dispuso en un baño de hielo que contenía cloruro sódico, que reduce la temperatura del baño de hielo, y la temperatura se midió cuando la muestra se sacó para el análisis. Se tomó una alícuota de cada muestra y se preparó para análisis de HPLC.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 1 y la Tabla 2. La cantidad de TBA, 20% (v/v) y 30% (v/v), usada en el experimento (Fig. 1) se basó en los estudios de estabilidad descritos en el presente documento.

- 5 Como se indica en la Fig. 1, la solubilidad de bendamustina disminuyó linealmente con la temperatura (25°C a 0°C). La solubilidad de bendamustina dependió de la temperatura tanto si se disolvió en agua sola como con un alcohol. El 20% (v/v) de TBA puede ser probablemente el límite más bajo requerido para la eficiente y robusta fabricación farmacéutica debido a la estabilidad y solubilidad de bendamustina. Una disolución de envasado de 15 mg/ml de bendamustina está próxima al límite de saturación de 17,2 mg/ml de bendamustina a 5°C, pero superior al límite a 0°C. El 30% (v/v) de TBA es la concentración recomendada de TBA para la formulación final y está perfectamente dentro del límite de solubilidad independientemente de la temperatura.

### Ejemplo 3 - Estabilidad

#### 15 A. Estabilidad en agua

Se prepararon disoluciones de bendamustina (15 mg/ml) y manitol (25,5 mg/ml) en agua a temperatura ambiente y se dispusieron inmediatamente en un baño de hielo (para reducir rápidamente la temperatura a aproximadamente 5°C) durante 10 minutos y luego se refrigeraron a 5°C. Una muestra de cada formulación se analizó por HPLC usando los procedimientos descritos en el presente documento después de 0, 3, 6 y 24 horas, luego se almacenó a 5°C.

#### B. Estabilidad en alcoholes

25 Se prepararon disoluciones que contenían 15 mg/ml de bendamustina, 25,5 mg/ml de manitol y 1,9%, 5%, 10%, 20% o 30% (v/v) de alcohol etílico en agua o 5%, 10%, 20% o 30% (v/v) de TBA, metanol, propanol, iso-propanol o butanol en agua a temperatura ambiente, se dispusieron en un baño de hielo durante 10 minutos y luego se refrigeraron a 5°C. Una muestra de cada formulación se analizó por HPLC después de 0, 3, 6 y 24 horas, luego se almacenó a 5°C.

#### 30 C. Resultados de estabilidad

La Tabla 3 muestra los resultados de estabilidad de bendamustina en agua sin adición de alcohol durante un periodo de 24 horas a 5°C. La bendamustina se degrada rápidamente en agua, pero la estabilidad de la bendamustina aumenta con concentraciones de alcohol crecientes (Figs. 2, 3 y 4). Aunque los alcoholes se usan frecuentemente en la liofilización para ayudar en problemas de solubilidad, el efecto de los alcoholes sobre la estabilidad de la bendamustina es único, inesperado y útil en la fabricación de bendamustina con menos impurezas, ya que puede usarse una disolución acuosa mientras que se mantenga la estabilidad de la bendamustina. Se encontró que TBA era el mejor estabilizador de los seis alcoholes probados (Fig. 2, 3, y 4). Todos los alcoholes al 30% (v/v) redujeron la formación de impurezas de HP1 y dímero a 5°C durante hasta 24 horas. Con respecto a TBA, HP1 alcanza sólo aproximadamente el 0,4% cuando se almacena a 5°C durante hasta 24 horas. Menores concentraciones de alcohol pueden no ser eficientes cuando se formulan a 15 mg/ml de bendamustina y se almacenan a 5°C debido a la precipitación de bendamustina y formación de impurezas.

#### 45 Ejemplo 4 - Optimización de la formulación

Después de determinar la solubilidad y estabilidad de la bendamustina, la formulación se optimizó para la liofilización. Como la concentración de bendamustina es mayor en una disolución saturada al 30% de TBA/agua en comparación con otras disoluciones de alcohol, se tiene previsto que el tamaño de vial requerido para envasar 100 mg de bendamustina pueda disminuirse de la actual presentación de Ribomustin®. Aunque una disolución saturada de bendamustina contiene 18 mg/ml a 0°C, una concentración de 15 mg/ml se seleccionó para la formulación para compensar las ligeras diferencias en la solubilidad de PAF debidas a diferencias en la pureza de PAF a granel como resultado de diferencias de lotes. Una concentración de 15 mg/ml de bendamustina requiere 6,67 ml para envasar 100 mg de HCl de bendamustina por vial.

55 La relación del área superficial (sublimación) con respecto al volumen es crítica para producir un producto liofilizado con buen aspecto que se liofiliza rápidamente. Generalmente, los productos liofilizados ocupan entre el 30% y el 50% del volumen del vial. Un vial de 20 ml con 6,67 ml contiene aproximadamente el 30% de su capacidad y tiene una relación de área superficial de 0,796 cm<sup>2</sup>/ml.

60 El manitol se seleccionó como agente de carga con el fin de mantener una formulación similar a Ribomustin®. Se realizaron estudios para evaluar el efecto del manitol sobre la solubilidad de bendamustina y el aspecto del producto. El manitol disminuye la solubilidad de la bendamustina (a 15 mg/ml) en disoluciones acuosas tanto de etanol como de TBA. Por ejemplo, disoluciones que contienen 5% y 10% de etanol y TBA sin manitol no precipitaron durante 24 horas. Sin embargo, para muestras con manitol (Tabla 1) se observó precipitado en el plazo de 24 horas. No hubo precipitado con disoluciones acuosas que contenían 30% (v/v) de TBA, 15 mg/ml de bendamustina y 25,5 mg/ml de

manitol. Con el fin de mantener una torta bien formada resistente a la rotura durante la manipulación se requirió un mínimo de 134 mg/vial de manitol sin diferencia observada en viales de hasta 200 mg/vial de manitol.

5 Todos los alcoholes probados aumentaron la estabilidad y solubilidad de la bendamustina. Sin embargo, se requirió una fracción molar significativa para afectar la estabilidad de la disolución envasada y la facilidad de fabricación. Alcoholes más pequeños tienen el indeseable efecto de reducir el punto de congelación de la disolución a granel y, por tanto, requieren largos ciclos de liofilización a menores temperaturas. Mayores concentraciones de metanol y etanol produjeron tortas pocas atractivas que fueron difíciles de reconstituir. Se prepararon y se liofilizaron disoluciones acuosas al 10% de etanol, 20% de etanol, 10% de iso-propanol, 20% de iso-propanol o 30% de TBA que contenían bendamustina (15 mg/ml), manitol (25,5 mg/ml). Los viales liofilizados envasados con las disoluciones al 10% de etanol, 20% de etanol, 10% de iso-propanol, 20% de iso-propanol produjeron tanto una torta colapsada como un residuo de película. El único sistema de disolvente que produjo una torta aceptable fue 30% de TBA. Adicionalmente, la reconstitución de viales liofilizados de 10% de etanol, 20% de etanol, 10% de iso-propanol, 20% de iso-propanol fue difícil y no se disolvieron completamente hasta >45 minutos.

15 La capacidad para utilizar un vial más pequeño está limitada por la concentración o solubilidad de la bendamustina en la disolución acuosa/orgánica. A menores concentraciones de etanol, metanol, isopropanol y n-propanol, que produjeron aspecto de torta aceptable, se requiere una disolución más diluida de bendamustina debido a las limitaciones de la solubilidad. Para mantener una presentación con 100 mg de bendamustina por vial se requeriría un vial de más de 50 ml. Por tanto, los estudios de estabilidad en el presente documento indicaron que a la menor concentración de alcohol, la estabilidad química no era suficiente para permitir tiempos de envasado aceptables.

20 Uno de los factores que afectan la facilidad de reconstitución es la porosidad del liofilizado. En general, precipitados amorfamente sólidos con poca área superficial son más difíciles de solubilizar. La mayoría de los liofilizados que contienen manitol se reconstituirán en el plazo de 3-5 minutos, mientras que no se forme precipitado durante la liofilización, frecuentemente producido mediante evaporación de un líquido (refusión). Basándose en la experiencia de los presentes inventores con varios sistemas de disolvente para la liofilización y sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, los problemas asociados a la reconstitución de Ribomustin® pueden asociarse a la precipitación producida por la refusión durante la liofilización. La mayoría de los disolventes orgánicos no se liofilizan eficientemente y producen refusión debido a su bajo punto de fusión. El TBA (alcohol *terc*-butílico) tiene un alto punto de fusión y una presión de vapor similar en comparación con el agua. El TBA se elimina por sublimación, no evaporación, a aproximadamente la misma tasa que el agua. Los liofilizados producidos con 30% (v/v) de TBA según la invención se reconstituyen en el plazo de 3-10 minutos en comparación con Ribomustin comercialmente disponible, que puede durar 30-45 minutos.

35 Basándose en la solubilidad, estabilidad, facilidad de reconstitución y consideraciones de fabricación, lo siguiente es una formulación de pre-liofilización preferida de la presente invención: HCl de bendamustina aproximadamente 15 mg/ml, manitol aproximadamente 25,5 mg/ml, aproximadamente 30% (v/v) de alcohol *terc*-butílico y c.s.p. usando agua para inyección. La formulación se envasa luego a 5°C usando 6,67 ml en un vial de 20 mm de 20 ml ámbar y se tapona parcialmente con un tapón de bromobutilo y se carga en un liofilizador previamente enfriado.

#### Ejemplo 5 - Evaluación de impurezas

45 Impurezas importantes introducidas durante el procesamiento de fabricación, mezcla, envasado y liofilización de Ribomustin®, como se ha determinado por análisis de HPLC (Fig. 6), son el producto de hidrólisis HP1, el dímero y el éster *etilico* de bendamustina, BM1EE. BM1EE puede formarse durante la fabricación del principio activo, por ejemplo, durante procedimientos de recristalización y/o purificación. Se sabe que BM1EE es un fármaco citotóxico más potente que la bendamustina. Se realizaron experimentos para determinar si el uso de una disolución de envasado acuosa de 30% de TBA conduciría a formación de éster *t-butílico* de bendamustina.

50 Se realizaron experimentos usando condiciones de reacción de esterificación de Fisher tradicionales requeridas para la formación de éster *t-butílico* de bendamustina. La bendamustina se calentó en TBA a 60°C con HCl durante 20 horas. No se observó reacción. Este resultado indicó que sería muy difícil formar el éster *terc*-butílico de bendamustina durante el procedimiento de envasado/acabado. Hasta la fecha no se han observado nuevas impurezas en el producto terminado fabricado a partir de TBA en estudios de estabilidad.

60 Para ayudar en el ensayo del producto terminado se desarrollaron rutas de síntesis usando fuentes más reactivas del resto de *t-butilo*. Se llevó a cabo un intento por preparar éster *terc*-butílico mediante la formación del cloruro de acilo de bendamustina. Una suspensión de bendamustina en cloruro de metileno se trató con cloruro de oxalilo y N,N-dimetilformamida. Después de formarse cloruro de acilo, el disolvente se concentró. El residuo se añadió a cloruro de metileno, *terc*-butanol, trietilamina y 4-dimetilaminopiridina, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de añadir todos los disolventes y purificación, se añadió un compuesto desconocido. El EM-CL no se correspondió con el peso molecular del éster *terc*-butílico de bendamustina y la RMN de protones no mostró el pico para *terc*-butilo. Por tanto, también fracasó este intento por producir el éster *terc*-butílico de bendamustina. Por tanto, el uso de TBA como co-disolvente tiene un beneficio adicional de no formar el éster a partir del alcohol.

Ejemplo 6 - Desarrollo del ciclo de liofilización

5 Se realizaron numerosos ciclos de liofilización para evaluar los estados críticos de liofilización y alcanzar el ciclo de secado más eficiente. Los experimentos se realizaron para evaluar el efecto de la tasa de congelación, temperatura de secado primario, tiempo y presión sobre el producto.

A. Tasa de congelación

10 La bibliografía informa de que TBA adopta diferentes formas cristalinas dependiendo de la tasa de congelación. En algunas disoluciones de TBA, cuanto más lento se congele el producto, más rápido se seca. Se formaron cristales más grandes durante la lenta congelación, produciendo poros más grandes que permitieron una sublimación más eficiente. Sin embargo, durante los estudios con bendamustina, no se encontró que la tasa de congelación fuera un parámetro de procesamiento crítico cuando se evaluó a 2 y 8 horas.

B. Secado primario y secundario

20 Durante los primeros intentos por liofilizar disoluciones al 30% de TBA, la torta liofilizada se fracturó y el polvo se expulsó del vial. Estas tortas parecieron contener partículas amorfas dentro del liofilizado, una indicación de refusión. Este fenómeno fue reproducible y se produjo cuando el producto alcanzó aproximadamente -10°C (se refiere a la Fig. 5) independiente de la tasa de calentamiento. Se probaron varias variables para determinar la causa y solución al problema de la expulsión de polvo. La presión se elevó de 50 µm a 150 µm durante el secado primario, pero la expulsión de polvo todavía se observó, pero a un menor grado. Entonces, este experimento se repitió, excepto que la tasa de congelación se prolongó a 8 horas de 2 horas. Este cambio no tuvo efecto.

25 A continuación se evaluó la duración del secado primario. Por ejemplo, se evaluó el siguiente ciclo de secado muy lento: congelación de +25°C a -50°C en ocho horas; mantenimiento a -50°C durante 5 horas, calentamiento y secado de -50°C a -25°C en siete horas; mantenimiento durante veinte horas a -25°C, calentamiento y secado de -25°C a -15°C en dos horas y mantenimiento durante veinte horas a -15°C, calentamiento y secado de -15°C a 40°C en seis horas y mantenimiento durante veinte horas a 40°C mientras se mantenía una presión de la cámara de 150 µm durante todo el secado. No se observó expulsión de polvo (Fig. 5). Este ciclo produjo una torta bien formada sin fractura que se reconstituyó fácilmente. Sin desear ligarse a teoría particular, los problemas con la expulsión de polvo y la dificultad con la reconstitución pueden ser el resultado de secar el liofilizado demasiado rápido, produciendo así un fuerte flujo de vapor fuera de la torta, además de refusión. Con el uso de un ciclo de secado menos agresivo se formó reproduciblemente una torta estética, estable y fácil de reconstituir. Por tanto, el eliminar toda el agua sin unir y alcohol *terc*-butílico antes del secado secundario puede prevenir la refusión, además de la expulsión de polvo. El ciclo de liofilización se optimizó adicionalmente bajo estas condiciones suaves (Fig. 5). No hubo productos de degradación inmediata como resultado de secar a 40°C durante hasta 20 horas.

Ejemplo 7 - Ciclo de liofilización

Etapa	Descripción	Tiempo (hora)	Temperatura (°C)	Presión (micrómetros)
1	Mantenimiento	0,25	5°C	-
2	Rampa	8	-50°C	-
3	Mantenimiento	4	-50°C	-
4	Rampa	3	-20°C	150
5	Mantenimiento	6	-20°C	150
6	Rampa	1	-15°C	150
7	Mantenimiento	20	-15°C	150
8	Rampa	0,5	-12°C	150
9	Mantenimiento	15,5	-12C	150
10	Rampa	15	35C	50
11	Mantenimiento	10	35°C	50
12	Rampa	1	40C	50
	Mantenimiento	5	40C	50
Total		89,25	-	-

Todas las composiciones y procedimientos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden hacerse y ejecutarse sin excesiva experimentación en vista de la presente divulgación.

45 Todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de aquellos expertos habituales en la materia a la que la invención se refiere.

50 La invención descrita ilustrativamente en el presente documento puede ponerse adecuadamente en práctica en ausencia de cualquier elemento no específicamente desvelado en el presente documento. Por tanto, por ejemplo, en cada caso en el presente documento, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en"

5 y "que consiste en" puede sustituirse con cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que han sido empleados se usan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por tanto, debe entenderse que aunque la presente invención se ha desvelado específicamente por realizaciones preferidas y características opcionales, la modificación y variación de los conceptos desvelados en el presente documento puede ser recurrida por aquellos expertos en la materia, y que tales modificaciones y variaciones se consideran que están dentro del alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

10

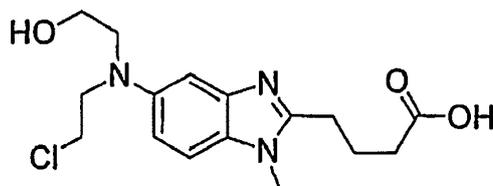
## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una preparación liofilizada de bendamustina o clorhidrato de bendamustina que comprende

a) disolver bendamustina o clorhidrato de bendamustina en una concentración estabilizante de *tert*-butanol que comprende entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 100% (v/v) de *tert*-butanol para formar una disolución de pre-liofilización; y

b) liofilizar la disolución de pre-liofilización;

en el que la preparación liofilizada de bendamustina o clorhidrato de bendamustina contiene no más de aproximadamente el 0,9% (porcentaje en área de bendamustina o clorhidrato de bendamustina) de HP1:



HP1

en el tiempo cero después de la reconstitución de la preparación liofilizada de bendamustina o clorhidrato de bendamustina.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho *tert*-butanol está a una concentración de aproximadamente el 20% al 30%.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho *tert*-butanol está a una concentración de aproximadamente el 30%.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la disolución de pre-liofilización comprende aproximadamente 15 mg/ml de clorhidrato de bendamustina, aproximadamente 25,5 mg/ml de manitol, aproximadamente 30% (v/v) de *tert*-butanol, y agua.

5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa b) comprende

i) congelar la disolución de pre-liofilización a una temperatura por debajo de aproximadamente -40°C para formar una disolución congelada;

ii) mantener la disolución congelada a o por debajo de -40°C durante al menos 2 horas;

iii) elevar la disolución congelada a una temperatura de secado primario entre aproximadamente -40°C y aproximadamente -10°C para formar una disolución secada;

iv) mantener durante aproximadamente 10 a aproximadamente 70 horas;

v) elevar la disolución secada a una temperatura de secado secundario entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 40°C; y

vi) mantener durante aproximadamente 5 a aproximadamente 40 horas para formar la preparación liofilizada de bendamustina o clorhidrato de bendamustina.

6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa b) comprende:

i) congelar la disolución de pre-liofilización a aproximadamente -50°C para formar una disolución congelada;

ii) mantener la disolución congelada a aproximadamente -50°C durante al menos 2 horas a aproximadamente 4 horas;

iii) elevar a una temperatura de secado primario entre aproximadamente -20°C y aproximadamente -12°C para formar una disolución secada;

iv) mantener a una temperatura de secado primario durante aproximadamente 10 a aproximadamente 48 horas;

v) elevar la disolución secada a una temperatura de secado secundario entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 40°C; y

vi) mantener a una temperatura de secado secundario durante al menos 5 horas hasta aproximadamente 20 horas.

7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la preparación liofilizada de bendamustina o clorhidrato de bendamustina contiene no más de aproximadamente el 0,5% de HP1, preferentemente aproximadamente el 0,4% de HP1, en el tiempo cero después de la reconstitución de la preparación liofilizada de bendamustina o clorhidrato de bendamustina.

8. Una formulación para la liofilización que comprende bendamustina o clorhidrato de bendamustina a una concentración de aproximadamente 15 mg/ml, manitol a una concentración de aproximadamente 25,5 mg/ml, alcohol *tert*-butilico a una concentración de aproximadamente 30% (v/v), y agua.

9. Una composición farmacéutica pre-liofilizada de bendamustina que comprende aproximadamente 15 mg/ml de clorhidrato de bendamustina, aproximadamente 25,5 mg/ml de manitol, aproximadamente 30% (v/v) de alcohol *terc-butílico*, y agua.

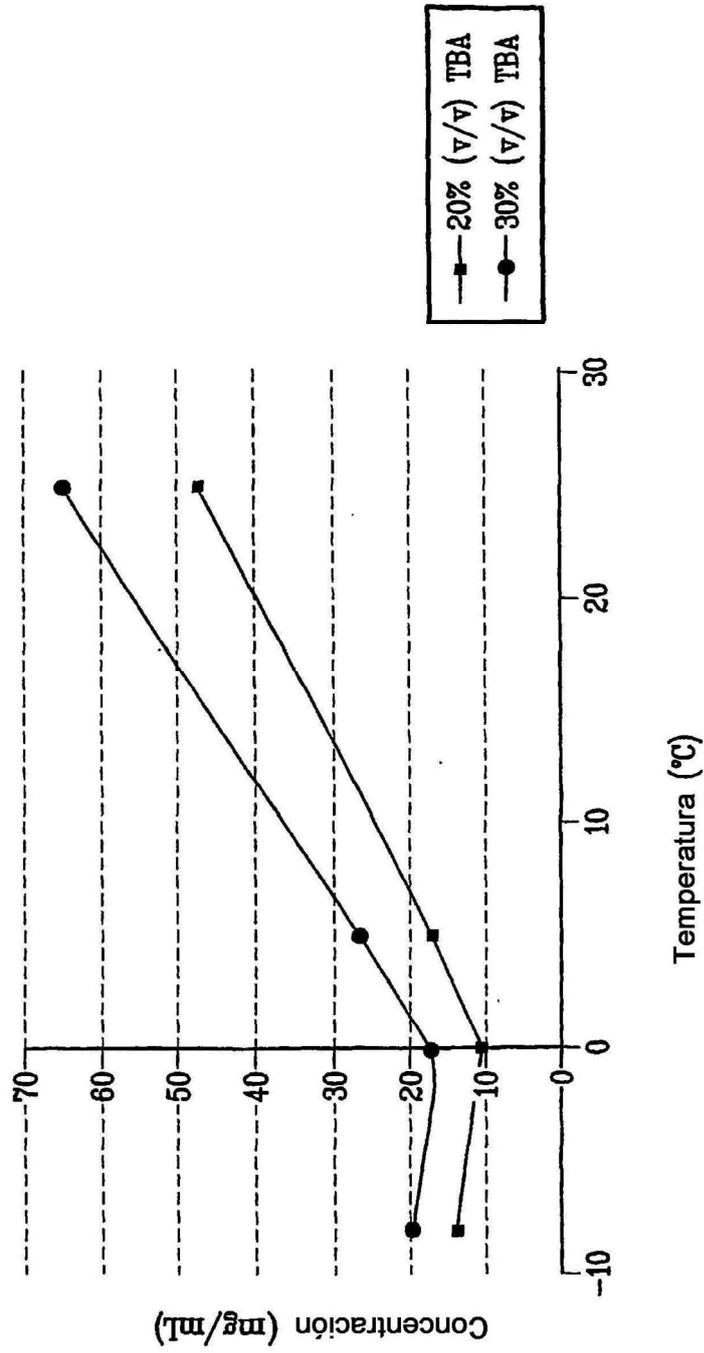


FIG. 1

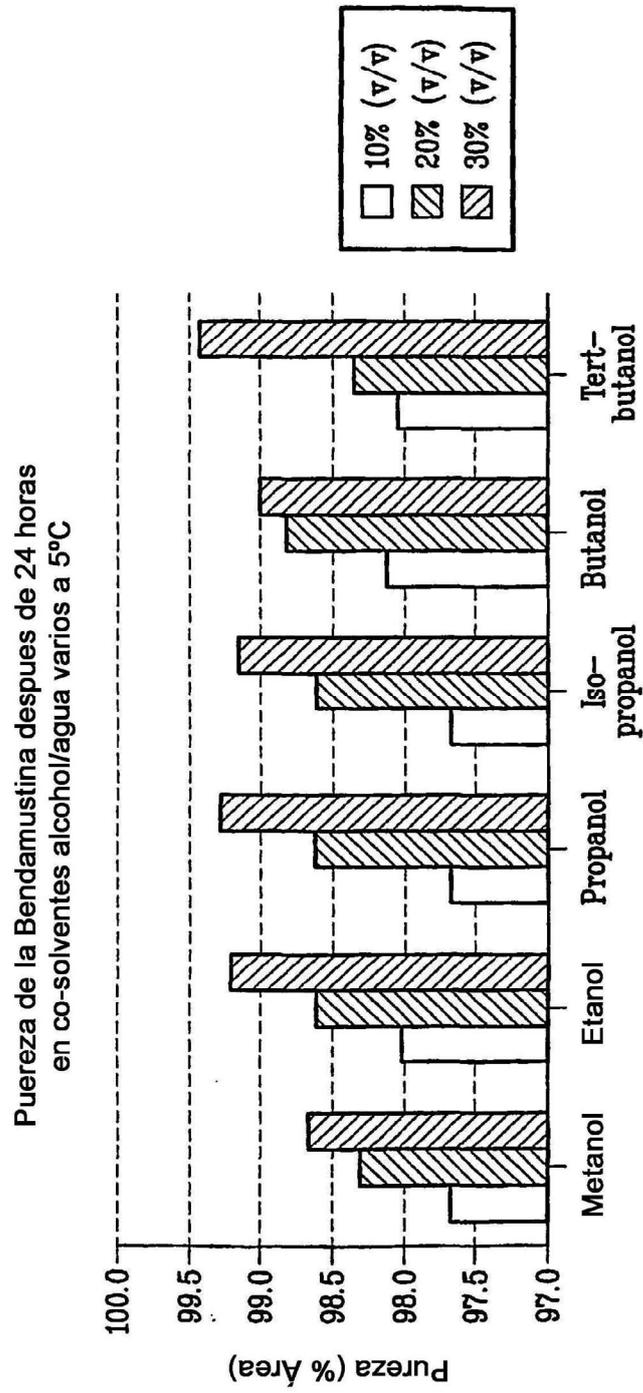


FIG. 2

Formación de HP1 después de 24 horas en diversos co-disolventes de alcohol/agua a 5°C

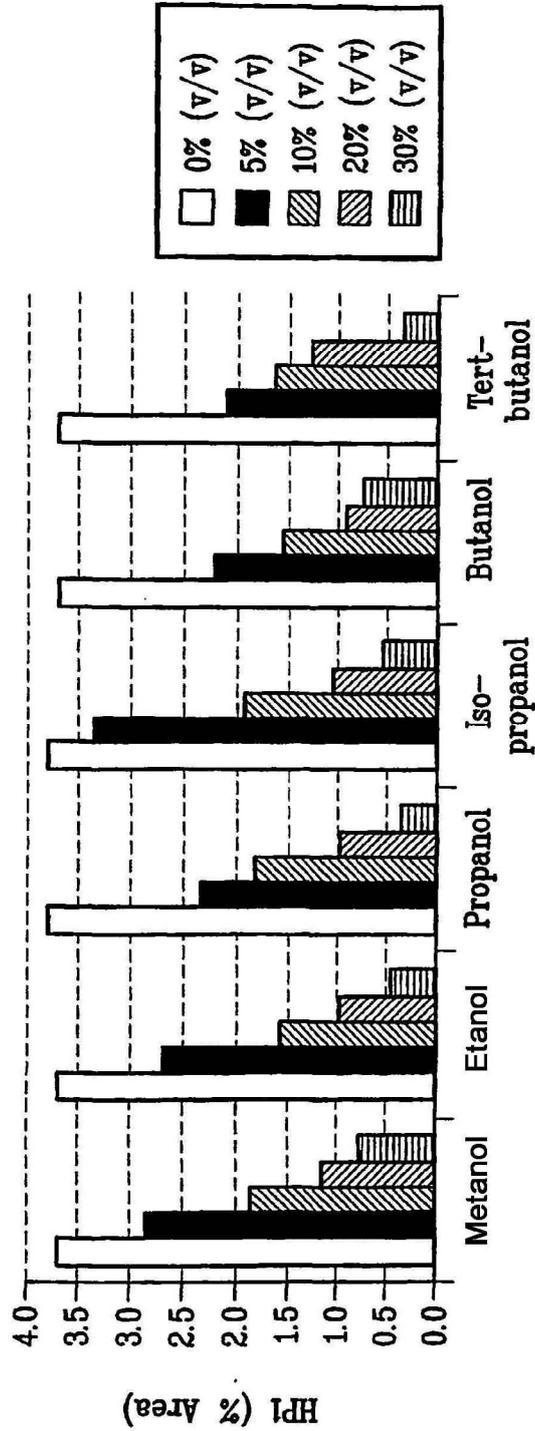


FIG. 3

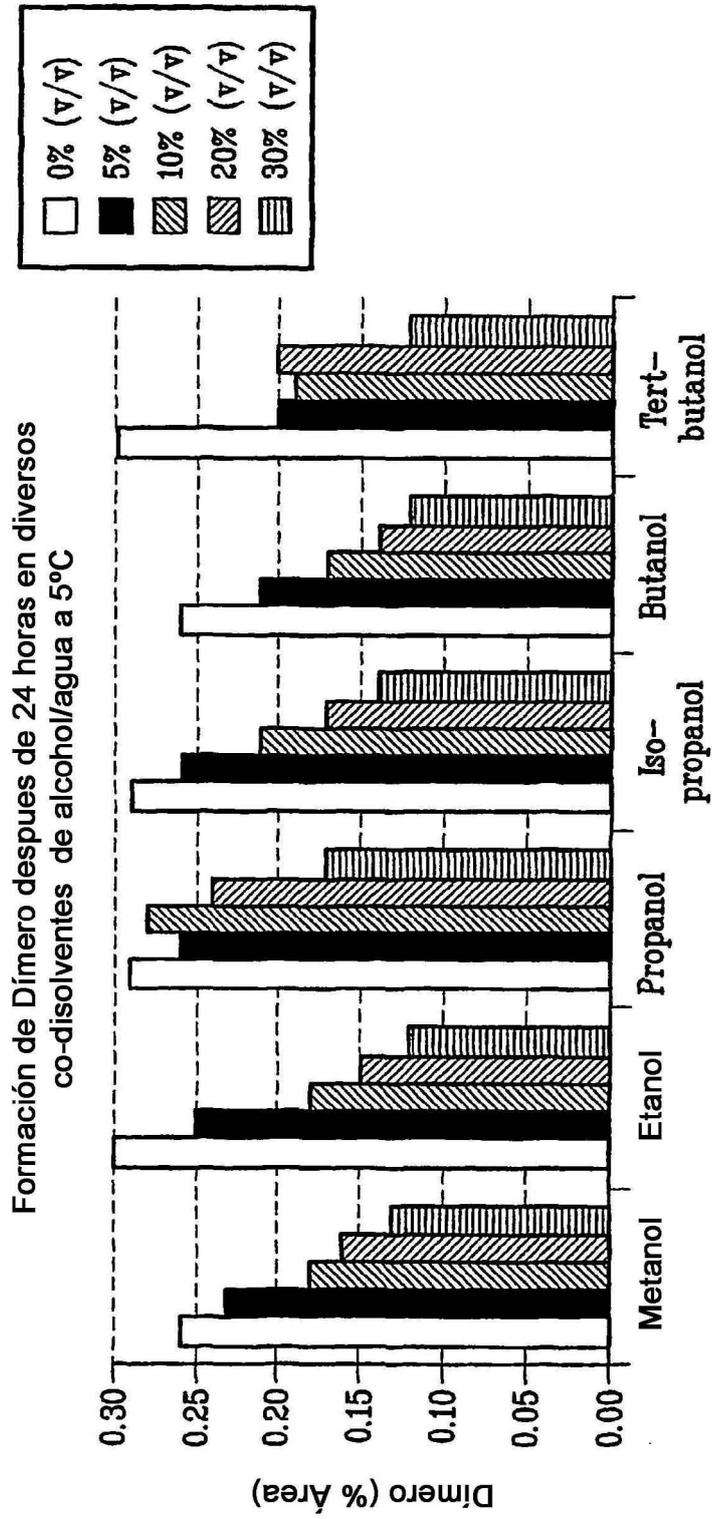


FIG. 4

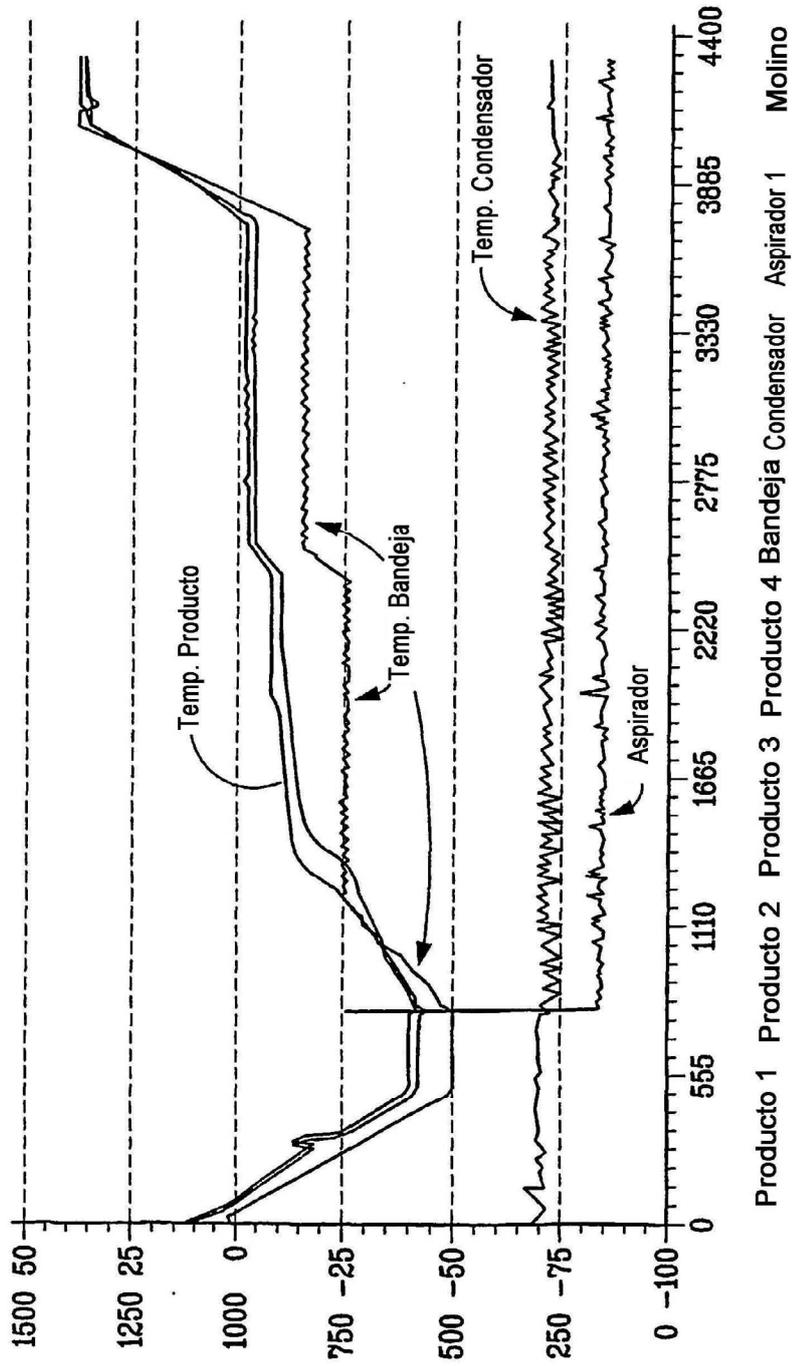


FIG. 5

