

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 205**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/14** (2006.01)

**A61K 9/19** (2006.01)

**A61K 31/4184** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2009 PCT/US2009/001956**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2009 WO09120386**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2009 E 09723661 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2271315**

54 Título: **Formas sólidas de clorhidrato de bendamustina**

30 Prioridad:

**26.03.2008 US 39752 P**

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

**13.03.2017**

73 Titular/es:

**CEPHALON, INC. (100.0%)  
41 Moores Road P.O. Box 4011  
Frazer, PA 19355, US**

72 Inventor/es:

**COOPER, MARTIN, IAN;  
COURVOISIER, LAURENT, D.;  
EDDLESTON, MARK y  
MCKEAN, ROBERT, E.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones:**

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

ES 2 605 205 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

## Formas sólidas de clorhidrato de bendamustina

5

## CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una forma sólida de clorhidrato de bendamustina como se define en la reivindicación 1, una composición que comprende la forma sólida como se define en la reivindicación 4, y la composición para el uso definido en la reivindicación 5.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

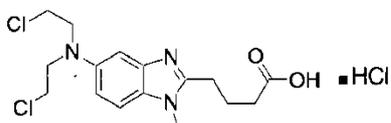
Pueden prepararse principios activos farmacéuticos (PAIs) en una variedad de formas diferentes, por ejemplo, derivados químicos, solvatos, hidratos, co-cristales o sales. Los PAIs también pueden prepararse en diferentes formas sólidas, en las que pueden ser amorfos, pueden existir como diferentes polimorfos cristalinos, y/o en diferentes estados de solvatación o hidratación. Variando la forma de un PAI, es posible variar las propiedades físicas del mismo. Por ejemplo, formas sólidas de un PAI normalmente tienen diferentes solubilidades de forma que una forma sólida más termodinámicamente estable sea menos soluble que una forma sólida menos termodinámicamente estable. Las formas sólidas también pueden diferenciarse en propiedades tales como la estabilidad en almacén, biodisponibilidad, morfología, presión de vapor, densidad, color y compresibilidad. Por consiguiente, la variación del estado sólido de un PAI es una de las muchas formas en las que modular las propiedades físicas y farmacológicas del mismo.

15

20

## Bendamustina, ácido 4- {5-[bis(2-cloroetil)amino]-1-metil-2-benzimidazolil}butírico:

25



30

El clorhidrato de bendamustina fue sintetizado inicialmente en 1963 en la República Democrática Alemana (RDA) y estuvo disponible allí de 1971 a 1992 bajo el nombre comercial Cytostasan®. Véase, por ejemplo, W. Ozegowski and D. Krebs, IMET 3393  $\gamma$ -[1-methyl-5-bis-( $\beta$ -chloroethyl)-aminobenzimidazole-(2)]-butyryl chloride, a new cytostatic agent of the group of benzimidazole nitrogen mustards. Zbl. Pharm. 110, (1971) Heft 10,1013-1019, que describe la síntesis del clorhidrato de bendamustina monohidratado. Desde entonces, se ha comercializado en Alemania con el nombre comercial Ribomustin®. La bendamustina es un agente alquilante que se ha mostrado que tiene utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades tales como leucemia linfocítica crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple y cáncer de mama.

35

40

Aunque se ha demostrado que la bendamustina es eficaz, se sabe que es inestable, especialmente en disoluciones acuosas, conduciendo a dificultades técnicas en su preparación y administración. Los investigadores, por tanto, han investigado métodos de mejora de la preparación y estabilidad de la bendamustina y sus formulaciones. Por ejemplo, la patente alemana (GDR) N.º 159877 desvela un método de preparación de base libre de bendamustina haciendo reaccionar el precursor de bis-hidroxiilo con cloruro de tionilo seguido de recristalización en agua.

45

La patente alemana (GDR) N.º 34727 desvela un método de preparación de derivados de bendamustina. Los derivados descritos se diferencian de la bendamustina en la sustitución en la posición 1.

50

La patente alemana (GDR) N.º 80967 desvela una preparación inyectable de clorhidrato de bendamustina monohidratado, ácido ascórbico y agua. GDR 80967 describe que la liofilización de compuestos tales como la bendamustina solo es posible si el compuesto es de estabilidad suficiente que pueda resistir a las condiciones de procesamiento. La preparación descrita en GDR 80967 no está liofilizada.

55

La patente alemana (GDR) N.º 159289 desvela una disolución inyectable lista para uso de clorhidrato de bendamustina que evita la liofilización. GDR 159289 describe una disolución anhidra de clorhidrato de bendamustina en 1,2-propilenglicol o etanol.

60

La solicitud de EE.UU. N.º 11/330.868, presentada el 12 de enero de 2006, cedida a Cephalon, Inc., Frazer, PA, desvela métodos de preparación de composiciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden clorhidrato de bendamustina.

65

En vista de los posibles beneficios de las diferentes formas sólidas de PAIs y en vista de la eficacia de la bendamustina, existe la necesidad de identificar y preparar novedosas formas sólidas de clorhidrato de bendamustina.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

Se describen formas sólidas de clorhidrato de bendamustina, además de métodos de su preparación. La invención se refiere a una forma sólida de clorhidrato de bendamustina que es la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina. Esta forma sólida de clorhidrato de bendamustina produce un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende las siguientes reflexiones: 25,1, 22,9, 22,0, 18,5, 16,8 y 14,1  $\pm$  0,2 grados 2 $\theta$ , o produce un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende además una o más de las siguientes reflexiones: 17,5, 24,9 y 28,3  $\pm$  0,2 grados 2 $\theta$ .

Otra realización de la invención se refiere a composiciones que comprenden la forma sólida de clorhidrato de bendamustina descrita anteriormente. En ciertas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica que comprende además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, la composición es una composición liofilizada. En ciertas realizaciones, la composición comprende una única forma sólida de clorhidrato de bendamustina y está sustancialmente libre de otras formas sólidas. Alternativamente, la composición puede contener una mezcla de formas sólidas, tales como una mezcla de una forma cristalina de clorhidrato de bendamustina y bendamustina amorfa.

También se describen métodos de preparación de las composiciones, y métodos de uso de las mismas para su uso en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple o cáncer de mama.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La FIG. 1 es un espectro de RMN <sup>1</sup>H de clorhidrato de bendamustina

La FIG. 2 es un difractograma de polvo de rayos X (XRPD) de la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina

La FIG. 3 es un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina

La FIG. 4 es un termograma del análisis termogravimétrico (TGA) de la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina

La FIG. 5 es una traza de la sorción gravimétrica de vapor (GVS) de la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina

La FIG. 6 es un difractograma de polvo de rayos X de la Forma 2 de clorhidrato de bendamustina

La FIG. 7A es un termograma de DSC de la Forma 2 de clorhidrato de bendamustina

La FIG. 7B es un termograma de DSC de la Forma 2 de clorhidrato de bendamustina usando una velocidad de calentamiento de 2 °C por minuto.

La FIG. 8 es un termograma de TGA de la Forma 2 de clorhidrato de bendamustina

La FIG. 9 es una traza de GVS de la Forma 2 de clorhidrato de bendamustina

La FIG. 10 es un difractograma de polvo de rayos X de la Forma 3 de clorhidrato de bendamustina

La FIG. 11 es un difractograma de polvo de rayos X de la Forma 4 de clorhidrato de bendamustina

La FIG. 12 es un termograma de DSC de la Forma 4 de clorhidrato de bendamustina

La FIG. 13 es un difractograma de polvo de rayos X de clorhidrato de bendamustina amorfo

La FIG. 14 es un difractograma de polvo de rayos X de una muestra que comprende clorhidrato de bendamustina amorfo, la Forma 4 de clorhidrato de bendamustina y manitol (Lote N.º 426804).

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS**

Se desvelan en el presente documento cuatro polimorfos de clorhidrato de bendamustina cristalino (denominados en el presente documento la Forma 1, Forma 2, Forma 3 y Forma 4). También se describe clorhidrato de bendamustina amorfo (es decir, no cristalino). Los datos espectrales referentes a estas formas sólidas de clorhidrato de bendamustina se representan en las FIGS. 1-14, y se presentan métodos de preparación de cada una de estas formas.

Estas formas sólidas polimórficas pueden identificarse, por ejemplo, por difracción de rayos X de polvo y caracterizarse por uno, dos, tres, cuatro, cinco o más picos de reflexión que son característicos de cada forma polimórfica. Los cuatro polimorfos cristalinos (Forma 1, Forma 2, Forma 3, Forma 4) y el clorhidrato de bendamustina amorfo también pueden identificarse por referencia a sus termogramas de DSC, termogramas de TGA y/o trazas de GVS, que se exponen en las FIGS. 1-14. Pueden realizarse métodos de preparación de formas sólidas de bendamustina, que incluyen cada uno de los polimorfos descritos, o una mezcla de polimorfos, y clorhidrato de bendamustina amorfo usando las técnicas descritas en el presente documento.

Cualquiera de las formas sólidas de clorhidrato de bendamustina descritas en el presente documento puede ser un componente de una composición que comprende clorhidrato de bendamustina. En algunas realizaciones, estas composiciones que comprenden al menos una de las formas sólidas de clorhidrato de bendamustina en el presente documento se describen sustancialmente libres de otras formas sólidas de clorhidrato de bendamustina.

Ciertas de las realizaciones preferidas de la invención pueden caracterizarse, al menos en parte, por difracción de rayos X de polvo. Como se conoce en la técnica, los sólidos cristalinos producen un patrón de difracción distintivo de picos, representado en lo que se denomina un difractograma. Las asignaciones de picos para un material cristalino dado, por ejemplo, valores de  $2\theta$  grados, pueden variar ligeramente, dependiendo de la instrumentación usada para obtener el difractograma y ciertos otros factores, por ejemplo, preparación de muestras. Sin embargo, estas variaciones no deben ser superiores a  $\pm 0,2$  grados  $2\theta$  y la separación relativa entre los picos en el difractograma siempre será la misma, independientemente de la instrumentación usada o el método de preparación de muestras, y similares.

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas que comprenden además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Excipientes preferidos incluyen, por ejemplo, fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido cítrico, ácido tartárico, gelatina, glicina, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa, glicerina, dextrosa, dextrano, trehalosa, heta-almidón, o una mezcla de los mismos. Un excipiente farmacéutico más preferido es manitol.

En otra realización de la invención son composiciones liofilizadas que comprenden al menos un forma sólida de clorhidrato de bendamustina como se describe en el presente documento. Las composiciones liofilizadas preferidas de la invención incluyen aquellas que comprenden una mezcla de clorhidrato de bendamustina amorfo y al menos una forma cristalina de clorhidrato de bendamustina.

Las composiciones liofilizadas de la invención pueden incluir además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Excipientes preferidos incluyen, por ejemplo, fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido cítrico, ácido tartárico, gelatina, glicina, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa, glicerina, dextrosa, dextrano, trehalosa, heta-almidón, o una mezcla de los mismos. n excipiente farmacéutico más preferido es manitol. Se desvelan composiciones liofilizadas que consisten esencialmente en clorhidrato de bendamustina amorfo, la Forma 4 de clorhidrato de bendamustina, y manitol (véase, por ejemplo, la FIG. 14)

La Forma 1 se caracterizó como un polvo blanco que consistía en partículas en forma de listón. La Forma 1 fue cristalina por difracción de rayos X de polvo (XRPD), el espectro de RMN  $^1\text{H}$  estuvo de acuerdo con la estructura de la molécula, y la pureza fue del 97,2 %. El análisis térmico mostró una endoterma con aparición a  $167\text{ }^\circ\text{C}$  ( $\Delta\text{H } 103\text{ J/g}$ ) correspondiente a un evento de fusión (Pico =  $170\text{ }^\circ\text{C}$ ). Se produjo degradación por encima de esta temperatura. La muestra llegó a ser amorfa por XRPD (FIG. 13) tras calentar a  $180\text{ }^\circ\text{C}$  (fusión) y siguió amorfa tras enfriar a temperatura ambiente. Se encontró que la Forma 1 tenía baja higroscopicidad, mostrando un aumento del 0,7 % en peso entre el 0 y el 90 % de humedad relativa (HR). Esto no condujo a un cambio significativo en el patrón de XRPD tras el re-análisis en condiciones ambiente. No hubo cambios significativos durante 1 semana de almacenamiento a  $40\text{ }^\circ\text{C} / 75\%$  de HR o 3 semanas de almacenamiento a  $40\text{ }^\circ\text{C} / 11\%$  de HR. Los datos de XRPD se muestran a continuación.

Datos de XRPD para la Forma 1 de HCl de bendamustina

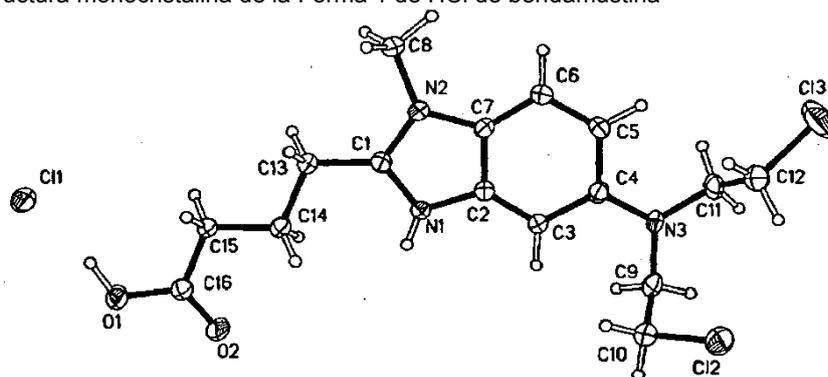
Ángulo( $2\theta$ )	valor-d (Angstrom)	Intensidad(Cuenta)	Intensidad (%)
8.349	10.59033	110	6.8
13.503	6.55757	129	8
14.049	6.30377	394	24.5
16.824	5.26978	190	11.8
17.51	5.06473	172	10.7
18.452	4.80625	167	10.4
20.239	4.36767	130	8.1
20.904	4.24957	257	16
21.544	4.12484	295	18.3
21.972	4.04537	980	60.9
22.354	3.97705	210	13.1
22.922	3.87977	1213	75.4
23.305	3.81696	215	13.4
23.672	3.7586	317	19.7
24.851	3.58278	833	51.8
25.122	3.54475	1608	100
25.858	3.44558	173	10.7
26.35	3.38229	254	15.8
27.082	3.29256	437	27.2
27.591	3.23295	343	21.3

(Continua)

Ángulo(2teta)	valor-d (Angstrom)	Intensidad(Cuenta)	Intensidad (%)
28.327	3.16055	704	43.8
20.155	3.06303	144	8.9
20.366	3.04246	151	9.4

La Forma 1 se convirtió en un hidrato de clorhidrato de bendamustina (Forma 2) durante 2 meses de almacenamiento a 25 °C / 94 % de HR. La solubilidad acuosa fue 4,5 mg/ml con un pH de disolución de 2,16, pero se produjo degradación significativa en la muestra en este experimento. Los valores de pKa encontrados para este material por UV en condiciones acuosas fueron 0,88 (base), 4,17 (ácido) y 6,94 (base). El valor del logP encontrado fue 1,10 con un logD a pH7,4 de 0,68. Se obtuvo la estructura monocristalina de esta forma:

Una vista de la estructura monocristalina de la Forma 1 de HCl de bendamustina



Datos de la celdilla unidad y los residuos finales para la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina

Datos cristalinos		Forma 1
Fórmula química		$[C_{16}H_{22}N_3O_2]^+ Cl^-$
Peso molecular		394,7
Sistema cristalino		monoclínico
Grupo espacial		C2/c
	-193 °C	22 °C
a (Å)	23,0847(4)	23,080(5)
b (Å)	6,80560(10)	6,882(2)
c (Å)	25,5054(5)	25,504(6)
beta (°)	114,2480(10)	114,09(1)
volumen (Å <sup>3</sup> )	3653,52(11)	3693,8(4)
Z		8
Densidad (calculada) (g/ml)	1,435	1,419
R (Fobs)		0,0382
wR (todos, Fsq)		0,1392
S		1,006

Se mostró que la Forma 1 era más estable a la degradación en luz, en comparación con la Forma 2.

La Forma 2, un monohidratado, se caracterizó como un polvo blanco que consistía en partículas en forma de varilla.

La Forma 2 fue cristalina por XRPD y la pureza fue del 98,3 %. Los datos de XRPD se representan a continuación.

5

Datos de XRPD para la Forma 2 de HCl de bendamustina

10

Ángulo(2teta)	valor-d (Angstrom)	Intensidad(Cuenta)	Intensidad (%)
10.169	8.69836	167	8.5
10.638	8.31653	1274	64.6
11.443	7.73271	155	7.9
12.46	7.10378	162	8.2
13.662	6.48137	186	9.4
15.055	5.88491	234	11.9
18.828	4.71319	631	32
19.724	4.50101	206	10.5
20.115	4.41437	955	48.4
20.451	4.34275	1017	51.6
20.95	4.24033	654	33.2
21.45	4.14261	371	18.8
22.15	4.01325	301	15.3
23.105	3.84943	1972	100
23.449	3.79375	373	18.9
23.859	3.72952	236	12
24.101	3.6926	271	13.7
24.511	3.6317	317	16.1
24.849	3.58309	290	14.7
25.204	3.53342	434	22
25.498	3.49344	320	16.2
25.843	3.44749	257	13
26.538	3.35877	788	40
27.248	3.27289	382	19.4
27.695	3.22103	402	20.4
28.018	3.18459	243	12.3
28.256	3.15834	248	12.6
28.487	3.13331	297	15
29.046	3.07423	352	17.9
29.255	3.0527	244	12.4

15

20

25

30

35

40

45

50

El análisis térmico mostró una amplia endoterma con aparición a 37 °C debido a la pérdida de agua. Ésta se correspondió con una pérdida de peso del 5,2 % tras calentar entre temperatura ambiente y 100 °C, igual a la pérdida de 1,2 equivalentes de agua, y una conversión en la Forma 4. La muestra mostró una captación del 4 % entre el 10 y el 15 % de HR durante el análisis de GVS, igual a 1 mol de agua. En el re-análisis de XRPD después de los ciclos de GVS se observó un pico a 14° 2θ. Este pico es indicativo de la presencia de la Forma 1, sugiriendo que se produjo conversión parcial durante el experimento de GVS. Se obtuvo una traza de XRPD similar después de guardar la Forma 1 pura a 25 °C / 94 % de HR durante un mes ya que la muestra estuvo en el proceso de convertirse en la Forma 2. No hubo cambios significativos en la muestra por XRPD después de un mes de almacenamiento a 40 °C / 75 % de HR, pero la muestra fue menos cristalina durante un mes a 40 °C / 11 % de HR. Se observó una disminución significativa en la cristalinidad y pureza durante experimentos de estabilidad a la luz.

60

Una revisión del estado de la técnica indica que un monohidratado de clorhidrato de bendamustina ha sido preparado previamente. Véase W. Ozegowski y D. Krebs, arriba. Ese monohidratado tiene un punto de fusión informado de 152-156 °C. Este punto de fusión es similar al observado con la Forma 2 de clorhidrato de bendamustina, que tiene un punto de fusión observado de 153-157 °C. Aunque no es definitivo, es posible que la Forma 2 y el clorhidrato de bendamustina monohidratado informados en el estado de la técnica sean el mismo polimorfo. Pero como no se ha informado de detalles de caracterización adicionales, por ejemplo XRPD, ni están

65

disponibles para el clorhidrato de bendamustina monohidratado informado en el estado de la técnica, no se sabe si el monohidratado informado previamente era la Forma 2 de clorhidrato de bendamustina.

El almacenamiento de la Forma 1, Forma 2 y mezclas 1:1 durante hasta 6 semanas solo mostró una conversión de la Forma 1 a 2 después del almacenamiento a alta humedad (60 °C/ 95 % de HR, 25 °C 94 % de HR y posiblemente 4 °C / 88 % de HR durante 6, 6 y 2 semanas, respectivamente). No se observó conversión de la Forma 2 en la Forma 1 en estos estudios después de 6 semanas. Los factores cinéticos dificultaron determinar la estabilidad termodinámica absoluta en las 6 semanas estudiadas y ambas formas fueron estables durante 6 semanas a 4 °C/ 34 a 76 % de HR, 25 °C/ 43 a 75 % de HR y 60 °C/ 11 a 75 % de HR.

La Forma 3 se caracterizó como un polvo blanco que era parcialmente cristalino por XRPD. No se observaron cambios significativos en el re-análisis de XRPD después de 1 mes de almacenamiento en condiciones ambiente, pero se produjo la conversión en la Forma 2 durante 1 semana a 40 °C / 75 % de HR. La pureza fue del 95,9 %. A continuación se muestran los datos de XRPD para la Forma 3.

Datos de XRPD para la Forma 3 de HCl de bendamustina

Ángulo(2teta)	valor-d (Angstrom)	Intensidad(Cuenta)	Intensidad (%)
3.85	22.95248	13.6	2.1
5.384	16.41406	16.3	2.5
5.75	15.37009	12.1	1.9
7.892	11.20261	40.4	6.2
10.575	8.36538	177	27.2
13.426	6.59478	30.1	4.6
13.636	6.49389	10.9	1.7
13.993	6.32693	36.3	5.6
14.7	6.0261	7.62	1.2
15.547	5.69958	121	18.6
15.734	5.63243	41.4	6.4
17.35	5.1112	25	3.8
17.608	5.0369	14.1	2.2
18.594	4.77186	55.1	8.5
18.85	4.70772	85.8	13.2
19.428	4.56899	80.2	12.3
19.749	4.49541	436	67
19.995	4.44068	173	26.6
21.3	4.17144	216	33.3
22.11	4.02037	233	35.8
23.328	3.81319	409	63
25.449	3.49996	393	60.5
25.571	3.48361	355	54.6
25.733	3.46204	294	45.3
26.063	3.41636	650	100
26.394	3.37675	305	46.9
26.61	3.34983	279	43
27.852	3.2032	393	60.5
27.977	3.1892	403	62
28.109	3.17455	392	60.3
29.039	3.07492	195	30

La Forma 4 se caracterizó como un polvo blanco que era cristalino por XRPD. El análisis térmico mostró una endoterma debida a la fusión a 153 °C (Pico = 157 °C). La Forma 4 se convirtió en la Forma 2 durante 24 horas en condiciones ambiente. A continuación se representan los datos de XRPD para la Forma 4.

Datos de XRPD para la Forma 4 de HCl de bendamustina

Ángulo(2teta)	valor-d (Angstrom)	Intensidad(Cuenta)	Intensidad (%)
3.86	22.88824	63.2	4.6
7.794	11.34336	120	8.8
10.267	8.61623	293	21.4
10.831	8.16867	1297	95
11.624	7.61314	149	10.9
11.804	7.4972	134	9.8
12.806	6.91286	169	12.4
14.077	6.29121	209	15.3
15.521	5.70899	376	27.5
18.038	5.5262	135	9.9
18.748	4.73313	168	12.3
19.636	4.52097	455	33.3
20.447	4.34345	1021	74.7
20.734	4.28411	793	58.1
21.227	4.18563	557	40.8
21.865	4.06498	202	14.8
22.263	3.99311	198	14.5
23.1	3.85031	306	22.4
23.579	3.77323	1366	100
23.95	3.71555	513	37.5
24.39	3.64947	250	18.3
24.548	3.62633	237	17.3
25.477	3.49624	266	19.5
25.81	3.45184	659	48.3
26.559	3.35619	258	18.9
27.101	3.29025	363	26.6
27.627	3.22885	818	59.9
28.415	3.14102	364	26.6

50 El clorhidrato de bendamustina amorfo tuvo una temperatura de transición vítrea de aproximadamente 50 °C y se convirtió en gomoso durante 24 horas en condiciones ambiente, que muestran que es higroscópico. Por tanto, se produjo cristalización parcial durante 1 semana a 40 °C / 75 % de HR, posiblemente dando una mezcla de las Formas 2 y 3. Después de someter al ciclo de humedad de GVS, el clorhidrato de bendamustina amorfo se convirtió en la Forma 2.

55 Composiciones farmacéuticas preferidas de la invención comprenden clorhidrato de bendamustina amorfo.

Se conocen en la técnica excipientes farmacéuticamente aceptables e incluyen aquellos descritos en, por ejemplo, la solicitud de EE.UU. N.º 11/267.010. Estas composiciones farmacéuticas pueden prepararse como inyectables, bien como disoluciones o suspensiones líquidas, además de formas sólidas, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, pastillas para chupar, pastillas, polvos, suspensiones y similares.

En realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas son composiciones sublimadas, preferentemente secadas por congelación o liofilizadas. También se desvelan métodos de preparación de tales preparaciones sublimadas, preferentemente secadas por congelación o liofilizadas, de clorhidrato de bendamustina que contienen la Forma 1, Forma 2, Forma 3, Forma 4, o una mezcla de las mismas.

La liofilización implica la adición de agua a un compuesto, seguido de congelación de la suspensión o disolución resultante, y sublimación del agua del compuesto. En métodos preferidos, al menos un disolvente orgánico se añade a la suspensión/disolución. En otros métodos preferidos, la suspensión/disolución comprende además un excipiente de liofilización. Las preparaciones liofilizadas de clorhidrato de bendamustina de la presente invención pueden comprender además clorhidrato de bendamustina amorfo.

En un procedimiento de liofilización típico, agua, se combinan un excipiente de liofilización farmacéuticamente aceptable, un disolvente orgánico y un compuesto para formar una disolución, que entonces se esteriliza, preferentemente usando metodología de esterilización por filtración. Esta disolución se liofiliza entonces usando equipo y técnicas de liofilización estándar.

Se prevé que también puedan usarse otras técnicas de sublimación. Por ejemplo, una o más de las formas descritas de clorhidrato de bendamustina pueden disolverse, dispersarse o suspenderse en un disolvente, congelarse la mezcla resultante (sea una disolución, dispersión o suspensión), y eliminarse el disolvente por sublimación.

Un excipiente de liofilización puede ser cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable que, cuando se use durante el proceso de liofilización, produzca un producto liofilizado que tiene propiedades mejoradas, por ejemplo, propiedades de manipulación mejoradas, propiedades de solubilidad, y similares. Un excipiente de liofilización puede ser, por ejemplo, un agente de carga; se conocen en la técnica agentes de carga adecuados. Ejemplos de excipientes de liofilización adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido cítrico, ácido tartárico, gelatina, glicina, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa, glicerina, dextrano, dextrano, trehalosa, heta-almidón, o mezclas de los mismos. Un excipiente de liofilización también puede comprender un antioxidante farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, ácido ascórbico, acetilcisteína, cisteína, hidrogenosulfito de sodio, butil-hidroxilanisol, butil-hidroxitolueno, o acetato de alfa-tocoferol. Un excipiente de liofilización preferido es manitol. 1.

Disolventes para su uso en los métodos desvelados incluyen agua y disolventes orgánicos que forman disoluciones estables con clorhidrato de bendamustina sin degradar apreciablemente la bendamustina, y que son capaces de ser evaporados/sublimados mediante liofilización. Ejemplos de disolventes orgánicos adecuados incluyen, por ejemplo, metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, terc-butanol, o mezclas de los mismos. Un disolvente orgánico preferido es terc-butanol.

Se desvelan métodos de preparación de composiciones liofilizadas que comprenden al menos una forma cristalina de clorhidrato de bendamustina. En otros métodos, las composiciones liofilizadas comprenden además clorhidrato de bendamustina amorfo.

Métodos preferidos de preparación de composiciones liofilizadas que comprenden al menos una forma cristalina de clorhidrato de bendamustina comprenden combinar clorhidrato de bendamustina con al menos un disolvente para formar una disolución y entonces liofilizar la disolución. En algunos métodos, la disolución comprende además al menos un excipiente de liofilización. Excipientes de liofilización preferidos incluyen, por ejemplo, fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido cítrico, ácido tartárico, gelatina, glicina, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa, glicerina, dextrano, dextrano, trehalosa, heta-almidón, o una mezcla de los mismos. Más preferentemente, el excipiente farmacéuticamente aceptable es manitol. En algunos métodos, el disolvente es agua, un disolvente orgánico, o una mezcla de los mismos. Preferentemente, el disolvente orgánico es metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, terc-butanol, o una mezcla de los mismos. Más preferentemente, el disolvente orgánico es terc-butanol. En ciertos métodos, el disolvente es una mezcla de agua y un disolvente orgánico, por ejemplo, una mezcla que tiene una relación de agua con respecto a disolvente orgánico de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 3:1 (v/v), preferentemente aproximadamente 7:3 (v/v).

Las composiciones liofilizadas producidas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento también están dentro del alcance de la invención. Un difractograma de polvo de rayos X de una composición, preparada según los procedimientos de liofilización descritos en el presente documento y que comprende clorhidrato de bendamustina amorfo, la Forma 4 de clorhidrato de bendamustina, y manitol se muestra en la Figura 14. Los datos de XPRD correspondientes a este difractograma se muestran a continuación.

Ángulo(2teta)	valor-d (Angstrom)	Intensidad(Cuenta)	Intensidad (%)
7.98	11.07642	231	6.3
9.75	9.06671	1710	47.0
10.58	8.35697	751	20.7

(Continua)

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40

Ángulo(2teta)	valor-d (Angstrom)	Intensidad(Cuenta)	Intensidad (%)
13.68	6.46585	30	0.8
15.43	5.73932	286	7.9
18.69	4.74293	91	2.5
19.48	4.55224	474	13.1
19.64	4.51705	799	22.0
19.89	4.45920	416	11.5
20.45	4.33901	3635	100.0
21.12	4.20296	1052	29.0
21.30	4.16740	545	15.0
22.15	4.01060	1349	37.1
22.76	3.90380	95	2.6
23.34	3.80874	293	8.1
24.72	3.59834	1153	31.7
25.30	3.51781	1396	38.4
25.43	3.50023	899	24.7
25.91	3.43569	454	12.5
27.95	3.19006	534	14.7
29.39	3.03627	35	1.0
29.73	3.00276	40	1.1
30.64	2.91594	38	1.1
31.20	2.86471	39	1.1
32.22	2.77642	109	3.0
33.65	2.66154	37	1.0
35.00	2.56159	287	7.9
35.34	2.53782	117	3.2
36.11	2.48539	682	18.8
36.23	2.47719	538	14.8
36.58	2.45430	105	2.9
38.04	2.36363	27	0.8
39.53	2.27806	36	1.0

45  
50  
55  
60  
65

También están dentro del alcance de la invención las composiciones de la invención para su uso en métodos para tratar enfermedades, tales como, por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, o cáncer de mama, con una composición farmacéutica de la presente invención.

También se desvelan métodos de uso de las formas sólidas de la invención para tratar linfoma no Hodgkin indolente de linfocitos B, en particular, linfoma no Hodgkin indolente de linfocitos B que ha progresado durante o en el plazo de los seis meses de tratamiento con, por ejemplo, rituximab o un régimen que contiene rituximab. En ciertos métodos, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención directamente al paciente (por ejemplo, cuando la composición farmacéutica es un comprimido o cápsula). En otros métodos, el método comprende modificar una composición farmacéutica de la presente invención antes de la administración, tal como disolviendo la composición en agua u otro disolvente antes de la administración. En estos métodos, el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación preparada a partir de una composición farmacéutica de la presente invención. Preferentemente, la preparación es una preparación inyectable. La preparación inyectable puede administrarse por vía subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intrarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional, intracaneal o mediante infusión. Otras afecciones susceptibles a tratamiento que utilizan las composiciones y preparaciones inyectables de la presente invención incluyen cáncer de pulmón de células pequeñas, trastornos hiperproliferativos y enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple y lupus.

Preferentemente, la dosis administrada es aproximadamente 100 mg/m<sup>2</sup> o aproximadamente 120 mg/m<sup>2</sup>, administrada por vía intravenosa. También están dentro del alcance de la invención dosificaciones de aproximadamente 25 mg/m<sup>2</sup>, 60 mg/m<sup>2</sup>, 50 mg/m<sup>2</sup> y 90 mg/m<sup>2</sup>, administradas por vía intravenosa. Preferentemente, la dosificación se administra por vía intravenosa durante aproximadamente 30 minutos o durante aproximadamente

60 minutos. También se prefieren métodos de administración en los que la dosificación se administra en los días 1 y 2 de un ciclo de 28 días. En algunas realizaciones, la dosificación se administra en de 1 a 6 o de 1 a 8 ciclos.

Las preparaciones inyectables en el presente documento se describen en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, como una suspensión o disolución acuosa u oleaginosas inyectables estériles formuladas según técnicas conocidas en la técnica. Normalmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan como polvos liofilizados que pueden proporcionarse, por ejemplo, en viales que contienen 100 mg de fármaco por vial de 50 ml o 20 ml. La preparación inyectable puede prepararse por reconstitución de una composición secada por pulverización o liofilizada con agua estéril para inyección y entonces dilución adicional con una disolución intravenosa farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, 0,9 % de cloruro sódico, 5 % de dextrosa en agua (D5W), disolución de Ringer con lactato, o 0,45 % de cloruro sódico/2,5 % de dextrosa.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de clorhidrato de bendamustina descritas en el presente documento se reconstituyen en una preparación inyectable, por ejemplo, con agua estéril, en menos de aproximadamente 20 minutos. Más preferentemente, la reconstitución se produce en menos de aproximadamente 10 minutos, lo más preferentemente aproximadamente 5 minutos.

Un proceso de reconstitución típico incluiría reconstituir, preferentemente asépticamente, 100 mg de clorhidrato de bendamustina con 20 ml de agua estéril para inyección. Esto da una disolución clara de incolora a amarilla pálida que tiene una concentración de HCl de bendamustina de 5 mg/ml. Si está siendo reconstituido clorhidrato de bendamustina liofilizado, el clorhidrato de bendamustina debe disolverse completamente en aproximadamente 5 minutos. El volumen necesario para la dosis requerida (basado en 5 mg/ml de concentración) puede extraerse asépticamente y transferirse a una bolsa de infusión de 500 ml de 0,9 % de cloruro sódico (u otra disolución intravenosa farmacéuticamente aceptable) para inyección. Preferentemente, la disolución reconstituida se transfiere a la bolsa de infusión en el plazo de 30 minutos desde la reconstitución. Después de la transferencia, el contenido de la bolsa de infusión se mezcla minuciosamente. La administración por infusión intravenosa normalmente se proporciona durante un periodo de tiempo de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos.

Se prevé que las composiciones farmacéuticas de la presente invención puedan administrarse en combinación con uno o más agentes antineoplásicos donde el agente antineoplásico se administra antes de, simultáneamente con, o posterior a la administración de la composición de la presente invención. Se conocen en la técnica agentes antineoplásicos farmacéuticamente aceptables. Agentes antineoplásicos preferidos son los desvelados en la solicitud de EE.UU. en tramitación junto con la presente N.º 11/330.868, presentada el 12 de enero de 2006.

Cantidades terapéuticamente eficaces de bendamustina pueden ser fácilmente determinadas por un especialista en diagnóstico responsable por el uso de técnicas convencionales. La dosis eficaz puede variar dependiendo de varios factores, que incluyen tipo y grado de progresión de la enfermedad o trastorno, salud general de un paciente particular, eficacia biológica de la bendamustina, formulación de bendamustina, y vía de administración de las formas de bendamustina. La bendamustina también puede administrarse a niveles de dosificación más bajos con aumentos graduales hasta que se logre el efecto deseado.

#### TERMINOLOGÍA

El término "antisolvente", como se usa en el presente documento, significa un disolvente en el que un compuesto es sustancialmente insoluble.

El término "cristalino", como se usa en el presente documento, significa que tiene una disposición regularmente repetitiva de moléculas o planos de caras externas.

El término "composición cristalina", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto químico sólido o mezcla de compuestos que proporciona un patrón característico de picos cuando se analiza por difracción de rayos X de polvo; esta incluye, pero no se limita a, polimorfos, solvatos, hidratos, co-cristales y solvatos desolvatados.

El término "aislar", como se usa en el presente documento, significa separar un compuesto de un disolvente, antisolvente, o una mezcla de disolvente y antisolvente, para proporcionar un sólido, semisólido o jarabe. Esto se lleva a cabo normalmente por medios tales como centrifugación, filtración con o sin vacío, filtración bajo presión positiva, destilación, evaporación o una combinación de los mismos. El aislamiento puede o puede no ir acompañado de purificación, durante la cual se aumenta la pureza química, quiral o química y quiral del aislado. La purificación se realiza normalmente por medios tales como cristalización, destilación, extracción, filtración a través de alúmina ácida, básica o neutra, filtración a través de carbón vegetal ácido, básico o neutro, cromatografía en columna sobre una columna rellena con una fase estacionaria quiral, filtración a través de un papel poroso, plástico o barrera de vidrio, cromatografía en columna sobre gel de sílice, cromatografía de intercambio iónico, recristalización, cromatografía líquida de alta resolución de fase normal, cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa, trituración y similares.

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es muy conocido en la técnica, tal como en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed.; Gennaro, A. R., Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000. Excepto en la medida de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones.

El término "disolución", como se usa en el presente documento, se refiere a una mezcla que contiene al menos un disolvente y al menos un compuesto que está al menos parcialmente disuelto en el disolvente.

El término "solvato", como se usa en el presente documento, significa una composición cristalina de estequiometría variable formada por un soluto y un disolvente orgánico como se define en el presente documento.

El término "disolvente", como se usa en el presente documento, significa una sustancia, normalmente un líquido, que es capaz de disolver completa o parcialmente otra sustancia, normalmente un sólido. Disolventes para la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agua, ácido acético, acetona, acetonitrilo, benceno, cloroformo, tetracloruro de carbono, diclorometano, sulfóxido de dimetilo, 1,4-dioxano, etanol, acetato de etilo, butanol, terc-butanol, N,N-dimetilacetamida, N,N-dimetilformamida, formamida, ácido fórmico, heptano, hexano, isopropanol, metanol, metiletilcetona (butanona), 1-metil-2-pirrolidinona, mesitileno, nitrometano, polietilenglicol, propanol, 2-propanona, propionitrilo, piridina, tetrahidrofurano, tolueno, xileno, mezclas de los mismos y similares.

El término "sublimación", como se usa en el presente documento, se refiere a la transición de la fase sólida a la fase gas sin etapa líquida intermedia.

El término "sustancialmente libre", como se usa en el presente documento con respecto a composiciones que contienen una forma particular de clorhidrato de bendamustina mientras que esté "sustancialmente libre" de otras formas del compuesto, significa que la forma citada está asociada a menos del 10 %, preferentemente menos del 5 %, en particular menos del 2 % y lo más preferentemente menos del 1 % de las otras formas citadas de clorhidrato de bendamustina.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad determinada que se requiere para producir el efecto fisiológico previsto y asociado a un fármaco dado, como se mide según métodos y técnicas farmacocinéticos establecidos, para la vía de administración dada. Pueden determinarse fácilmente cantidades terapéuticamente eficaces apropiadas y específicas por el especialista en diagnóstico responsable, como un experto en la materia, por el uso de técnicas convencionales. La dosis eficaz variará dependiendo de varios factores, que incluyen el tipo y grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del agente activo con excipientes apropiados, y la vía de administración.

## **INSTRUMENTACIÓN**

### **Difracción de rayos X de polvo (XRPD)**

Las novedosas formas cristalinas de clorhidrato de bendamustina se han caracterizado por XRPD que produce una huella dactilar de la forma cristalina particular. Las mediciones de valores  $2\theta$  normalmente son precisas hasta dentro de  $\pm 0,2$  grados.

#### Bruker AXS/Siemens D5000

Se recogieron patrones de difracción de rayos X de polvo en un difractómetro D5000 de Siemens usando radiación de  $\text{CuK}\alpha$  (40 kV, 40 mA), goniómetro  $\theta$ - $\theta$ , ranuras de divergencia y receptoras automáticas, un monocromador secundario de grafito y un contador de centelleo. El instrumento se comprueba para su rendimiento usando un patrón de corindón certificado (NIST 1976).

Condiciones ambiente - Se prepararon muestras ejecutadas en condiciones ambiente como especímenes de placa plana. Se cargaron suavemente aproximadamente 35 mg de la muestra en una cavidad cortada en oblea de silicio pulida de fondo cero (510) y se puso una cubierta de Mylar sobre la muestra. La muestra se giró en su propio plano durante el análisis.

#### Bruker AXS C2 GADDS

Se recogieron patrones de difracción de rayos X de polvo en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS usando radiación de  $\text{CuK}\alpha$  (40 kV, 40 mA), platina XYZ motorizada, videomicroscopio láser para el posicionamiento automático de muestras y un detector de área bidimensional de HiStar. La óptica de rayos X consiste en un único espejo multicapa de Göbel acoplado con un colimador estenopeico de 0,3 mm.

La divergencia del haz, es decir, el tamaño eficaz del haz del rayo X sobre la muestra, fue aproximadamente 5 mm. Se empleó un modo de barrido continuo  $\theta$ - $\theta$  con una distancia muestra - detector de 20 cm que da un intervalo  $2\theta$  eficaz de  $3,2^\circ$  -  $29,7^\circ$ . Normalmente, la muestra se expondría al haz de rayos X durante 120 segundos.

5 Condiciones ambiente - Se prepararon muestras ejecutadas en condiciones ambiente como especímenes de placa plana usando polvo sin triturar. Se comprimieron ligeramente aproximadamente 1-2 mg de la muestra sobre un portaobjetos de vidrio para obtener una superficie plana.

10 Condiciones no ambiente - Se montaron muestras ejecutadas bajo condiciones no ambiente sobre una oblea de silicio con compuesto conductor del calor. La muestra se calentó entonces a la temperatura apropiada a aproximadamente  $20\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y posteriormente se mantuvo isotérmicamente durante aproximadamente 1 minuto antes de iniciarse la recogida de datos.

#### 15 **Difracción de rayos X de monocristales (SCXRD)**

Los cristales elegidos se recubrieron con aceite Paratone y se congelaron criogénicamente en un difractor Bruker SMART CCD. Los datos se recogieron en un difractor Bruker AXS 1K SMART CCD equipado con un dispositivo de refrigeración Oxford Cryosystems Cryostream. Las estructuras se resolvieron usando tanto los programas SHELXS como SHELXD y se refinaron con el programa SHELXL como parte del paquete informático Bruker AXS SHELXTL. A menos que se establezca de otro modo, los átomos de hidrógeno unidos a carbono se colocaron geoméricamente y se dejó que se refinaran con un parámetro de desplazamiento isotrópico de movimiento. Los átomos de hidrógeno unidos a un heteroátomo se localizaron en una síntesis de Fourier de diferencia y se dejó que se refinaran libremente con un parámetro de desplazamiento isotrópico.

#### 25 **RMN $^1\text{H}$**

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se recogieron en un instrumento Bruker 400MHz equipado con un inyector automático y controlado por una consola DRX400. Se adquirieron experimentos automatizados usando ICON-NMR v4.0.4 (versión 1) ejecutando con Topspin v 1.3 (nivel de parche 6) usando los experimentos cargados de Bruker estándar. Para espectroscopía no rutinaria, se adquirieron datos mediante el uso de Topspin solo. Se prepararon muestras en  $d_6$ -DMSO, a menos que se establezca de otro modo. Se llevó a cabo análisis fuera de línea usando ACD SpecManager v 9.09 (versión 7703).

#### 35 **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Se recogieron datos de DSC en un Q1000 de TA Instruments equipado con un inyector automático de 50 posiciones. El instrumento se calibró para la calibración de energía y temperatura usando indio certificado. Normalmente, 0,5-2 mg de cada muestra, en un platillo de aluminio herméticamente cerrado con orificios, se calentaron a  $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  desde  $25\text{ }^\circ\text{C}$  hasta  $200\text{ }^\circ\text{C}$ . Se mantuvo una purga de nitrógeno a  $50\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  sobre la muestra. El software de control del instrumento fue Thermal Advantage v4.6.6 y los datos se analizaron usando Universal Analysis v4.3A.

#### **Análisis termogravimétrico (TGA)**

45 Se recogieron datos de TGA en un Q500 TGA de TA Instruments, equipado con un inyector automático de 16 posiciones. El instrumento se calibró para temperatura usando alumel certificado. Normalmente, se cargaron 1-2 mg de cada muestra en un platillo de DSC de aluminio herméticamente cerrado con orificios sobre un crisol de platino previamente tarado, y se calentó a  $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  desde temperatura ambiente hasta  $200\text{ }^\circ\text{C}$ . Se mantuvo una purga de nitrógeno a  $60\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  sobre la muestra. El software de control del instrumento fue Thermal Advantage v4.6.6 y los datos se analizaron usando Universal Analysis v4.3A.

#### **Análisis de pureza**

55 El análisis de pureza se realizó en un sistema de la serie HP1100 de Agilent equipado con un detector de matriz de diodos y usando el software ChemStation vB.02.01-SR1.

60

65

	Tipo de método	Fase Normal		Fase inversa	✓	
5		Isocrático		Inclinación		✓
	Columna:	Bono Zorbac-RP C14, 150x 4.6 mm, 5µm				
	Columna de Temperatura (°C)	30				
	Test de composición de muestra:	NMP/ Fase móvil A 1:1				
	Inyección (µ.l):	2				
10	Detección: Longitud, ancho de banda (nm)	254,8				
	Tasa de Flujo (ml.min-1)	1.0				
	Fase A:	0.1% TFA in wáter				
	Fase B:	0.1% TFA in acetonitrilo				
15	Programa	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B		
		0.0	95	5		
		1.0	80	20		
		2.3	5	95		
		3.3	5	95		
		3.5	95	5		
20		4.4	95	5		

### Solubilidad acuosa termodinámica por HPLC

25 Se determinó la solubilidad acuosa suspendiendo compuesto suficiente en 0,25 ml de agua para dar una concentración final máxima de  $\geq 10 \text{ mg.ml}^{-1}$  de la forma libre original del compuesto. La suspensión se equilibró a 25 °C durante 24 horas (a menos que se establezca de otro modo), después de lo cual se midió el pH. La suspensión se filtró entonces a través de un filtro de fibra de vidrio C en una placa de 96 pocillos. El filtrado se diluyó entonces un factor de 100 veces. La cuantificación fue por HPLC con referencia a una disolución de patrón de aproximadamente 0,1 mg.ml<sup>-1</sup> en DMSO. Se inyectaron diferentes volúmenes de las disoluciones de patrón, de muestra diluidas y sin diluir. La solubilidad se calculó usando las área del pico determinadas por integración del pico encontrado en el mismo tiempo de retención que el pico principal en la inyección de patrón.

35	Tipo de método	Fase inversa con elusión inclinada			
	Columna:	Fenomenex Luna, C18 (2)5µm 50x4.6 mm			
	Columna de Temperatura (°C)	25			
40	Inyección (µ.l):	5, 8 y 50			
	Detección: Longitud, ancho de banda (nm)	260,80			
	Tasa de Flujo (ml.min-1)	2			
	Fase A:	0.1% TFA in wáter			
	Fase B:	0.085% TFA in acetonitrilo			
45	Programa	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B	
		0.0	95	5	
		1.0	80	20	
		2.3	5	95	
		3.3	5	95	
		3.5	95	5	
50		4.4	95	5	

### 55 Sorción gravimétrica de vapor (GVS)

60 Se obtuvieron isotermas de sorción usando un analizador de la sorción de humedad IGASorp de Hiden, controlado por el software CFRSorp. La temperatura de las muestras se mantuvo a 25 °C por un baño de agua con recirculación de Huber. La humedad se controló mezclando corrientes de nitrógeno seco y húmedo, con un caudal total de 250 ml.min<sup>-1</sup>. La humedad relativa se midió por una sonda Vaisala RH calibrada (intervalo dinámico del 0-95 % de HR), situada cerca de la muestra. El cambio de peso (relajación de masa) de la muestra en función del % de HR se monitorizó constantemente por el microscopio (exactitud  $\pm 0,001 \text{ mg}$ ). Normalmente, se dispusieron 1-3 mg de muestra en una cesta de acero inoxidable de malla tarada en condiciones ambiente. La muestra se cargó y se descargó al 40 % de HR y 25 °C (condiciones ambiente típicas). Se realizó una isoterma de sorción de humedad como se expone brevemente a continuación (dando 2 barridos 1 ciclo completo). La isoterma del patrón se realizó a

25 °C a intervalos del 10 % de HR durante un intervalo de 0-90 % de HR.

Parámetro	Valor
Absorción Escaner 1	40-90
Desorción-Absorción escaner 2	85 Seco, Seco-40
Intervalos (%RH)	10
Número de escaners	2
Tasa de flujo (mi.min <sup>1</sup> )	250
Temperatura (°C)	25
Tiempo de Mínima sorción (horas)	1
Tiempo de máxima Sorción (horas)	4
Modo	AF2
Exactitud (%)	98

El software usa un procedimiento de minimización por mínimos cuadrados junto con un modelo de relajación de masa, para predecir un valor asintótico. El valor de relajación de masa medido debe estar dentro del 5 % del predicho por el software antes de seleccionar el siguiente valor de % de HR. El tiempo de equilibrado mínimo se estableció a 1 hora y el máximo a 4 horas.

#### Determinación y predicción de pKa

Se recogieron datos en un instrumento GIpKa de Sirius con un accesorio D-PAS. Las mediciones se hicieron a 25 °C en disolución acuosa por UV. El compuesto se disolvió inicialmente en DMSO a 5 mg/ml de los que 50 µl (0,25 mg) se usaron para la valoración del pH 1,3 a 9,0. El medio de valoración fue de fuerza iónica ajustada (ISA) con KCl (ac) 0,15 M. Los datos se refinaron usando el software Refinement Pro v1.0. La predicción de los valores de pKa se hizo usando el software de predicción de pKa ACD v9.

#### Determinación del log P

Se recogieron datos por valoración potenciométrica en un instrumento GIpKa de Sirius usando tres relaciones de octanol: agua de fuerza iónica ajustada (ISA) para generar valores de log P, log P<sub>ión</sub> y log D. Los datos se refinaron usando el software Refinement Pro v1.0. La predicción de los valores de log P se hizo usando el software ACD v9 y Syracuse KOWWIN v1.67.

#### Preparación de clorhidrato de bendamustina (bruto)

Etapa 1: Se disolvió éster etílico del ácido 4-{5-[bis-(2-hidroxi-etil)-amino]-1-metil-1H-benzoimidazol-2-il}-butírico (27,0 kg) en 270 kg de cloroformo. Después de enfriarse hasta 0 a 5 °C, se añadieron 19,2 kg de cloruro de tionilo durante aproximadamente 1 hora. La mezcla se calentó hasta 25 °C ± 5 °C y se agitó durante 20 a 24 horas. Entonces se añadieron 75,6 kg de ácido clorhídrico (disolución acuosa al 32 %). Después de la separación de fases, se eliminó la fase orgánica (inferior). El producto quedó en la fase acuosa.

Etapa 2: Se añadió una suspensión de carbón vegetal activado en ácido clorhídrico a la fase acuosa obtenida en la etapa 1. La mezcla se calentó durante 1 hora a 85 a 90 °C y se agitó durante 4 a 5 horas a reflujo. Entonces, la suspensión se filtró y se aclaró con ácido clorhídrico acuoso. El disolvente se separó por destilación a presión reducida a una temperatura que no superó 65 °C. Se añadieron 108 kg a 324 kg (preferido 108 kg) de agua desionizada caliente (35 a 45 °C) para inducir la cristalización.

Después de la cristalización, la mezcla se enfrió a 20 C ± 5 °C y se agitó durante 1 a 2 horas adicionales o durante la noche. El producto se recogió por filtración en una secadora de filtro, se lavó con tres porciones cada una de 108 a 324 kg (preferido 108 kg) de agua desionizada y 108 a 216 kg (preferido 108 kg) de acetona fría. El producto en bruto se trató cuatro veces cada una con 54 a 108 kg (preferido 54 kg) de acetona a reflujo durante al menos 1 hora, en la secadora de filtro. La suspensión se filtró y el producto se secó a una temperatura no superior a 40 °C a presión reducida, dando 21,4 kg ± 2,1 kg de clorhidrato de bendamustina en bruto (70 % ± 10 %, calculado como sustancia seca).

**Etapa 3 (opcional):** El producto obtenido de la etapa 2 se disolvió en ácido clorhídrico (disolución acuosa al 32 %) y se calentó a reflujo (85 a 90 °C) durante al menos 4 horas. Para mejorar el color, puede añadirse carbón vegetal activado al ácido clorhídrico y calentar la mezcla a reflujo (85 a 90 °C) durante al menos 4 horas. Con carbón vegetal activado, la suspensión se filtró y se aclaró con ácido clorhídrico acuoso. El disolvente se separó por destilación a presión reducida a una temperatura que no superó 65 °C. La mezcla se diluyó entonces con agua desionizada. Si no se produjo cristalización en el plazo de 15 min, la mezcla se sembró. Después de la cristalización, la suspensión se agitó a 40 °C ± 5 °C durante una hora, luego se enfrió a 20 °C ± 5 °C. Después de agitar 1 a 2 horas adicionales a 20 °C ± 5 °C, el producto se recogió por filtración, se lavó tres veces con agua desionizada fría, y al menos tres veces con acetona fría. El producto en bruto se trató cuatro veces con acetona a reflujo durante al menos 1 hora. La suspensión se filtró y el producto se secó a una temperatura no superior a 40 °C, a presión reducida. El rendimiento de clorhidrato de bendamustina en bruto fue del 80 % ± 10 %.

**Preparación de clorhidrato de bendamustina purificado**

Se suspendió HCl de bendamustina en bruto (15,0 kg) con 0,45 kg de carbón vegetal activado en etanol / agua (vol/vol = 97/3) a temperatura ambiente. La mezcla se calentó rápidamente a 75 a 80 °C y se agitó durante no más de 10 min a condiciones de reflujo. La mezcla se filtró para eliminar el carbón vegetal activado. Después de la filtración, se añadieron 33,0 kg de acetona filtrada rápidamente a 40-50 °C para inducir la cristalización.

Después de la cristalización, la mezcla se agitó durante 30 a 60 min a 40-50 °C, luego se enfrió a 0 a 5 °C, y se agitó durante al menos 30 min adicionales o durante la noche. El producto se recogió por filtración y se lavó con tres 45 kg de acetona fría. Después de eso, el producto en bruto se trató 4 veces cada una con 30 kg de acetona a reflujo durante al menos 1 hora. La suspensión se filtró y el producto se secó a una temperatura no superior a 40 °C a presión reducida proporcionando 11,3 ± 1,5 kg de clorhidrato de bendamustina (75 % ± 10 %).

**Preparación de disolución a granel (1 l) de clorhidrato de bendamustina**

Bajo condiciones estériles, se transfirió agua para inyección ("WFI," ~65 % del tamaño del lote total) a un recipiente de mezcla de acero inoxidable equipado con una mezcladora. La temperatura del WFI en el tanque de mezcla se ajustó a 15 a 25 °C. Se añadió manitol (25,5 g) al recipiente de mezcla y se mezcló durante un mínimo de 5 minutos mientras que se mantenía la temperatura de la disolución a 15 a 25 °C. Se añadió alcohol terc-butílico ("TBA," 234,2 g) al recipiente de mezcla. La disolución se mezcló durante un mínimo de 5 minutos a 15 a 25 °C. Se añadió HCl de bendamustina purificado (15,0 g) al recipiente de mezcla y se mezcló durante un mínimo de 10 minutos mientras que se mantenía la temperatura de la disolución entre 15 y 25 °C. Se añadió agua para inyección, USP, suficiente para enrasar el lote a 1 l y se mezcló durante un mínimo de 10 minutos. La disolución a granel se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 µm usando nitrógeno a 1-2 bar.

**Liofilización de la disolución a granel filtrada de clorhidrato de bendamustina**

**Etapa 1:** La disolución a granel de HCl de bendamustina esterilizada por filtración formulada se cargó en una máquina de llenado/taponado completamente automatizada. Los viales continuaron a la estación de taponado, donde se taponaron parcialmente con tapones previamente esterilizados. El medicamento de HCl de bendamustina se cargó a aproximadamente 6,47 g (6,67 ml) en un vial ámbar de vidrio de tubo de borosilicato tipo I de 20 cc. Los viales llenos y parcialmente taponados se transfirieron al liofilizador localizado en el área de liofilización.

**Etapa 2:** Los viales llenos y parcialmente taponados de la etapa 1 se transfieren al liofilizador equipado con ocho estantes que pueden cargarse con bandejas llenas de producto. Se liofilizaron los viales de medicamento llenos y parcialmente taponados. Un resumen del ciclo de liofilización usado durante la liofilización del medicamento de HCl de bendamustina se proporciona en la Tabla 1 a continuación.

**Tabla 1: Ciclo de liofilización para HCl de bendamustina**

Parámetros del proceso	Punto fijo de objetivo
Cargando temperatura	5°C
Temperature de congelación	Mantener a -50°C durante 4 horas
Vacio de Secado primario	150 micras
Temperatura de secado primario	Mantener a -15°C durante 27 horas
Temperatura de secado intermedio	Mantener a -12° C durante 7 horas
Vacio de secado secundario	50 micras
Temperatura de secado secundario	Mantener a 40° C durante 15 horas

Al final del ciclo de liofilización, la presión de la cámara se aumentó a ~0,6 bar con nitrógeno esterilizado por filtración. Los viales se taponaron hidráulicamente ajustando los estantes a la posición de taponado bajo atmósfera de nitrógeno esterilizada por filtración. Después de taponar los viales, se subieron los estantes, y la cámara se relleno con aire esterilizado por filtración a presión atmosférica para la descarga. Este procedimiento produce aproximadamente 100 mg de HCl de bendamustina/vial.

#### Preparación de disoluciones de clorhidrato de bendamustina

Se pesaron 50 mg de la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina en un vial tipo roscado. Se añadió disolvente en alícuotas (con calentamiento a 50 °C) hasta que se obtuvo una disolución transparente. Las observaciones se registran en la Tabla 2.

Tabla 2: Solubilidad del clorhidrato de bendamustina

Disolvente	Volumen añadido	¿Solución Obtenida?
Etanol	1ml	Si (50°C)
Acido Acético	1ml	Si (50°C)
Metanol	100µl	Si (50°C)
Formamida	1ml	Si (50°C)
DMF	500µl	Si (50°C)
DMSO	100µl	Si (50°C)
DMA	500µl	Si (50°C)

#### Experimento de maduración

Se suspendieron aproximadamente 10 mg de clorhidrato de bendamustina de la Forma 1 en la lista de disolventes en la Tabla 3. Las suspensiones se agitaron durante 48 horas alternando periodos de 4 horas a 50 °C y temperatura ambiente. Entonces se aisló cualquier material sólido por filtración y se analizó por XRPD. Se dejó que se evaporaran las disoluciones. Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Asignación de los resultados de XRPD de la maduración de clorhidrato de bendamustina

Disolución	Análisis XRPD	Disolución	Análisis XRPD
Etanol	Form 1	DCM	Form 1
Acetate Etilo	Form 1		
TBME	Form 1	Acetato metal	Form 1
IPA	Form 1	DMF	Hidrato (forma 2)
Acetato isopropilo	Form 1		
Acetona	Form 1	Dioxana	Form 1
THF	Form 1	Eter Dietilo	Form 1
Acetonitrilo	Form 1	Anisola	Form 1
Heptano	Form 1	MIBK	Form 1
Agua	Degradado	Nitrometano	Form 1
Tolueno	Form 1	DIPE	Form 1
Metanol	Mezcla de Forma 1 y Hidrato (forma2)	DMA	Hidrato (Forma 2)

**Cristalización de bendamustina por evaporación rápida**

Se dejó que se evaporaran disoluciones de clorhidrato de bendamustina en etanol, ácido acético, metanol, formamida, DMF, DMSO y DMA en condiciones ambiente dejando los viales de disolución sin tapar para evaporar a sequedad (denominado en el presente documento "evaporación rápida"). Los sólidos resultantes se analizaron por XRPD. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Asignación de los resultados de XRPD de la cristalización de clorhidrato de bendamustina por evaporación rápida

Disolución	Análisis XRPD
Etanol	Forma 1
Ácido Acético	Hidrato (forma 2)
Metanol	Mezcla de forma 1 y Hydratro (forma 2)
DMF	Forma 1
DMSO	Forma 1
DMA	Forma 1

**Cristalización de bendamustina por evaporación lenta**

Se dejó que se evaporaran disoluciones de clorhidrato de bendamustina en etanol, ácido acético, metanol, formamida, DMF, DMSO y DMA en condiciones ambiente dejando los viales de disolución tapados, teniendo las tapas de los viales orificios, para evaporar a sequedad en condiciones ambiente. La tasa de evaporación se limitó por el uso de cubiertas de película impermeables al aire que contenían pequeños orificios. Los sólidos resultantes se analizaron por XRPD. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Asignación de los resultados de XRPD de la cristalización de clorhidrato de bendamustina

Disolución	Análisis XRPD
Etanol	Forma 1
Ácido Acético	Forma 1
Metanol	Mezcla de forma 1 y Hydratro (forma 2)
Formamida	No se obtiene sólido
DMF	Material Insuficiente
DMSO	Forma 1*
DMA	No se Obtiene sólido
*Los datos de cristal único presentados aquí para el Formulario 1 se obtuvieron a partir de una muestra recristalizada en DMSO	

**Cristalización por antidisolvente**

Se añadió tolueno como antidisolvente a las disoluciones de clorhidrato de bendamustina en etanol, ácido acético, metanol, formamida, DMF, DMSO y DMA para estimular la cristalización. El volumen de tolueno añadido y las observaciones sobre la adición de antidisolvente se registran en la Tabla 6. Los sólidos se aislaron por filtración. Los sólidos resultantes se analizaron por XRPD. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Asignación de los resultados de XRPD de cristalización de clorhidrato de bendamustina por adición de antidisolvente

Disolución	Anti solución usado	Volumen de anti - solución	Observaciones	Analisis XRPD
Etanol	Tolueno	10 ml	No precipitado- Evaporado	Forma 1
5 Acido Acetico	Tolueno	0.5 ml	precipitado	Forma 1
DMF	Tolueno	0.5 ml	precipitado	Forma 1
DMSO	Tolueno	1 ml	precipitado	Forma 1
10 DMA	Tolueno	0.5ml	precipitado	Forma 1

### 15 Preparación de la Forma 2 a partir de la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina

Se añadió un ml de agua a 30 mg de la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina y la mezcla se calentó a 25 °C proporcionando una disolución transparente. Después de aproximadamente 4 minutos, la Forma 2 precipitó en disolución como un sólido blanco. El sólido se recogió por filtración.

### 20 Estabilidad de las Formas 1 y 2 de clorhidrato de bendamustina

Se almacenaron 10 mg de la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina (A), la Forma 2 de clorhidrato de bendamustina (B), y una mezcla 1:1 de las Formas 1 y 2 (C) en las condiciones enumeradas en la Tabla 7. Las muestras se analizaron por XRPD en los momentos de tiempo 1 día, 2 semanas y 6 semanas. Los resultados se muestran en la Tabla 7A. Bajo condiciones de alta humedad (~90 % de HR), se observó la conversión de la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina en la Forma 2. La tasa de esta conversión parece aumentar con la temperatura. Se midió la pureza de las Formas 1 y 2 después del almacenamiento a 4 °C / 87 % de HR (5) y 60 °C / 75 % de HR (13) durante 6 semanas. No se observaron grandes disminuciones de pureza.

30 Tabla 7. Condiciones del estudio de estabilidad del clorhidrato de bendamustina

Ondición	Temperatura	Humedad Relativa (% HR)
35 1	4	33.6 (lorido de Magnesio)
2	4	43.1 (Carbonato Potasico)
3	4	58.9 ( Nitrato de magnesio)
40 4	4	75.7 (Clorido de Sodio)
5	4	87.7 (Clorido de Potasio)
6	25	43.2 (Carbonato potasico)
45 7	25	57.6 (Bromido de Sodio)
8	25	75.3 (Clorido de Sodio)
9	25	93.6 (Nitrato de potasio)
50 10	60	11.0 (Clorido de Litio)
11	60	29.3 ( Clorido de Magnesio)
12	60	~43 (Carbonato de Potasio)
55 13	60	74.5 (Clorido de Sodio)
14	60	~95 (Sulfato de Potasio)

60 Tabla 7A. Análisis por XRPD de las muestras del estudio de estabilidad de clorhidrato de bendamustina

65

Condición	Análisis de XRPD después de 1 día	Análisis de XRPD después de 2 semanas	Análisis de XRPD después de 6 semanas
1	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
2	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
3	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
4	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
5	Sin cambios	C)Completamente convertido en forma 2	C) Ahora presente algo de Forma 1
6	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
7	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
8	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
9	Sin cambios	A)Parcilamente convertido en forma 2 c) Completamente Convertido en forma 2	A)Parcilamente convertido en forma 2 c) Completamente Convertido en forma 2
10	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
11	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
12	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
13	No realizado	Sin cambios	Sin cambios
14	No realizado	A)Parcilamente convertido en forma 2 B)Muestra delisquense c) Completamente Convertido en forma 2	A)Completamente convertido en forma 2 B)Muestra delisquense c) Completamente Convertido en forma 2

**Estabilidad a la luz del clorhidrato de bendamustina**

Se sometieron a estrés muestras de la Forma 1 y la Forma 2 de clorhidrato de bendamustina en una caja de luz Suntest con una intensidad de la luz de 250 vatios/m<sup>2</sup> durante 1 semana con la temperatura del cuerpo negro establecida a 25 °C. También se incluyó un blanco de cada muestra, envuelto en lámina para la protección, en el experimento. Después del experimento, las muestras se analizaron por XRPD y la pureza se determinó por HPLC. Se observó una disminución significativa en tanto la cristalinidad como la pureza para la Forma 2 durante la prueba de estrés por luz. A diferencia, la Forma 1 mostró solo una ligera disminución en la pureza. Véase la Tabla 8.

Tabla 8. Análisis de XRPD y de pureza de las muestras del estudio de estabilidad de clorhidrato de bendamustina

Muestra	XRPD	Pureza (%)
Forma 1 en Blanco	Sin cambio	97.3
Forma 1	Sin cambio (Muestra de color marrón)	95.9
Forma 2 en blanco	Sin cambio	95.6
Forma 2	Menos cristalina (Muestra de color Marrón)	68.7

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende clorhidrato de bendamustina en la que el clorhidrato de bendamustina es la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina.

La invención también se refiere a aquellas composiciones farmacéuticas que comprenden además clorhidrato de

bendamustina amorfo.

Otras realizaciones de la invención se refieren a una forma cristalina de clorhidrato de bendamustina en la que el clorhidrato de bendamustina es la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina.

La invención también se refiere a formas cristalinas de clorhidrato de bendamustina que tienen un patrón de difracción de rayos X de polvo sustancialmente como se representa en la FIG. 2. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden la forma cristalina de clorhidrato de bendamustina como se expone en el presente documento.

Otras realizaciones de la invención se refieren a una composición liofilizada que comprende clorhidrato de bendamustina que es la Forma 1 de bendamustina.

También se desvela un método de preparación de una composición liofilizada que comprende una forma cristalina de clorhidrato de bendamustina que comprende las etapas de combinar clorhidrato de bendamustina con al menos un disolvente para formar una mezcla; y liofilizar la mezcla. Preferentemente, los métodos incluyen aquellos en los que la disolución comprende además un excipiente de liofilización. Preferentemente, el excipiente de liofilización es fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido cítrico, ácido tartárico, gelatina, glicina, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa, glicerina, dextrosa, dextrano, trehalosa, heta-almidón, o una mezcla de los mismos. Más preferentemente, el excipiente de liofilización es manitol. Preferentemente, los métodos incluyen aquellos en los que el disolvente es agua, un disolvente orgánico, o una mezcla de los mismos. Preferentemente, el disolvente orgánico es metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, terc-butanol, o una mezcla de los mismos. Más preferentemente, el disolvente orgánico es terc-butanol. En otros métodos, el disolvente es una mezcla de agua y un disolvente orgánico. En métodos preferidos, la relación de agua con respecto a disolvente orgánico es aproximadamente 1:1 (v/v). En métodos preferidos, la relación de agua con respecto a disolvente orgánico es aproximadamente 2:1 (v/v). En métodos preferidos, la relación de agua con respecto a disolvente orgánico es aproximadamente 3:1 (v/v). En métodos preferidos, la relación de agua con respecto a disolvente orgánico es aproximadamente 7:3 (v/v).

También se desvelan métodos de tratamiento de leucemia linfocítica crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple o cáncer de mama que comprenden administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación preparada a partir de una composición como se describe en el presente documento.

También se desvelan métodos de preparación de clorhidrato de bendamustina de la Forma 1 que comprenden proporcionar una disolución de clorhidrato de bendamustina en etanol, acetato de etilo, terc-butil metil éter, alcohol isopropílico, acetato de isopropilo, diclorometano, acetato de metilo, acetona, tetrahydrofurano, acetonitrilo, heptano, tolueno, metanol, dioxano, éter dietílico, anisol, nitrometano, o éter di-isopropílico, y evaporar la disolución en condiciones ambiente.

También se desvelan métodos de preparación de clorhidrato de bendamustina de la Forma 1 que comprenden proporcionar una disolución de clorhidrato de bendamustina en etanol, metanol, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo o dimetilamina, y evaporar rápidamente la disolución a sequedad en condiciones ambiente.

También se desvelan métodos de preparación de clorhidrato de bendamustina de la Forma 1 que comprenden proporcionar una disolución de clorhidrato de bendamustina en etanol, ácido acético, metanol o sulfóxido de dimetilo, y evaporar lentamente la disolución a sequedad en condiciones ambiente.

También se desvelan métodos de preparación de clorhidrato de bendamustina de la Forma 1 que comprenden proporcionar una disolución de clorhidrato de bendamustina en ácido acético, formamida, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo o dimetilamina, y añadir una cantidad suficiente de tolueno para inducir la cristalización.

También se desvelan métodos de preparación de clorhidrato de bendamustina de la Forma 2 que comprenden proporcionar una disolución de clorhidrato de bendamustina en dimetilformamida, metanol o dimetilamina, y evaporar la disolución en condiciones ambiente.

También se desvelan métodos de preparación de clorhidrato de bendamustina de la Forma 2 que comprenden proporcionar una disolución de clorhidrato de bendamustina en ácido acético o metanol, y evaporar rápidamente la disolución a sequedad en condiciones ambiente.

También se desvelan métodos de preparación de clorhidrato de bendamustina de la Forma 2 que comprenden proporcionar una disolución de clorhidrato de bendamustina en metanol y evaporar lentamente la disolución a sequedad en condiciones ambiente.

También se desvelan métodos de preparación de clorhidrato de bendamustina de la Forma 2 que comprenden proporcionar una cantidad de clorhidrato de bendamustina de la Forma 1 y guardar la cantidad a una humedad relativa de al menos aproximadamente el 88 % durante un periodo de tiempo suficiente para convertir la Forma 1 en

la Forma 2.

5 También se desvelan métodos de preparación de clorhidrato de bendamustina de la Forma 2 que comprenden combinar la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina con agua para formar una disolución y dejar que la Forma 2 precipite en la disolución.

10 También se desvelan métodos de preparación de clorhidrato de bendamustina de la Forma 3 que comprenden proporcionar una cantidad de clorhidrato de bendamustina amorfo y guardar la cantidad a aproximadamente 40 °C y aproximadamente 75 % de humedad relativa durante un periodo de tiempo suficiente para convertir el clorhidrato de bendamustina amorfo en la Forma 3.

15 También se desvelan métodos de preparación de clorhidrato de bendamustina de la Forma 4 que comprenden proporcionar una cantidad de clorhidrato de bendamustina de la Forma 2 y calentar la Forma 2 a aproximadamente 100 °C durante un periodo de tiempo suficiente para convertir la Forma 2 en la Forma 4.

También se desvelan métodos de preparación de una composición farmacéutica de clorhidrato de bendamustina que comprenden las etapas de:

20 preparar la Forma 1 de clorhidrato de bendamustina; y combinar la Forma 1 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se desvelan métodos de preparación de una composición farmacéutica de clorhidrato de bendamustina que comprenden las etapas de:

25 preparar la Forma 2 de clorhidrato de bendamustina; y combinar la Forma 2 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se desvelan métodos de preparación de una composición farmacéutica de clorhidrato de bendamustina que comprenden las etapas de:

30 preparar la Forma 3 de clorhidrato de bendamustina; y combinar la Forma 3 con un excipiente farmacéuticamente aceptable

35 También se desvelan métodos de preparación de una composición farmacéutica de clorhidrato de bendamustina que comprenden las etapas de:

preparar la Forma 4 de clorhidrato de bendamustina; y combinar la Forma 4 con un excipiente farmacéuticamente aceptable

40 También se desvelan métodos de preparación de una composición liofilizada de clorhidrato de bendamustina que comprenden las etapas de combinar clorhidrato de bendamustina de la Forma 1 con un disolvente para formar una mezcla; y liofilizar la mezcla. El clorhidrato de bendamustina de la Forma 1 se prepara según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

45 También se desvelan métodos de preparación de una composición liofilizada de clorhidrato de bendamustina que comprenden las etapas de combinar clorhidrato de bendamustina de la Forma 2 con un disolvente para formar una mezcla; y liofilizar la mezcla. El clorhidrato de bendamustina de la Forma 1 se prepara según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

50 También se desvelan métodos de preparación de una composición liofilizada de clorhidrato de bendamustina que comprenden las etapas de combinar clorhidrato de bendamustina de la Forma 3 con un disolvente para formar una mezcla; y liofilizar la mezcla. En ciertos métodos, el clorhidrato de bendamustina de la Forma 3 se prepara proporcionando una cantidad de clorhidrato de bendamustina amorfo y guardando la cantidad a aproximadamente 40 °C y aproximadamente 75 % de humedad relativa durante un periodo de tiempo suficiente para convertir el clorhidrato de bendamustina amorfo en la Forma 3.

60 También se desvelan métodos de preparación de una composición liofilizada de clorhidrato de bendamustina que comprenden las etapas de: combinar clorhidrato de bendamustina de la Forma 4 con un disolvente para formar una mezcla; y liofilizar la mezcla. En ciertos métodos, el clorhidrato de bendamustina de la Forma 4 se prepara proporcionando una cantidad de clorhidrato de bendamustina de la Forma 2 y calentando la Forma 2 a aproximadamente 100 °C durante un periodo de tiempo suficiente para convertir la Forma 2 en la Forma 4.

65 También se desvelan composiciones liofilizadas que comprenden clorhidrato de bendamustina amorfo, en las que dicha composición está sustancialmente libre de cualquier clorhidrato de bendamustina cristalino.

En métodos preferidos de preparación de una composición liofilizada de clorhidrato de bendamustina, las mezclas

descritas comprenden además un excipiente de liofilización. Preferentemente, el excipiente de liofilización es fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido cítrico, ácido tartárico, gelatina, glicina, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa, glicerina, dextrosa, dextrano, trehalosa, heta-almidón, o una mezcla de los mismos. En métodos más preferidos, el excipiente de liofilización es manitol.

5 En métodos preferidos de preparación de una composición liofilizada de clorhidrato de bendamustina, el disolvente es agua, un disolvente orgánico, o una mezcla de los mismos. Preferentemente, el disolvente orgánico es metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, terc-butanol, o una mezcla de los mismos. En métodos más preferidos, el disolvente orgánico es terc-butanol.

10 En métodos preferidos de preparación de una composición liofilizada de clorhidrato de bendamustina, el disolvente es una mezcla de agua y un disolvente orgánico. Preferentemente, la relación de agua con respecto a disolvente orgánico es aproximadamente 1:1 (v/v). También se prefieren aquellos métodos en los que la relación de agua con respecto a disolvente orgánico es aproximadamente 2:1 (v/v). En otros métodos preferidos, la relación de agua con respecto a disolvente orgánico es aproximadamente 3:1 (v/v). En otros métodos preferidos, la relación de agua con respecto a disolvente orgánico es aproximadamente 7:3 (v/v).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una forma sólida de clorhidrato de bendamustina que es la Forma 1 y que produce un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende las siguientes reflexiones: 25,1, 22,9, 22,0, 18,5, 16,8 y  $14,1 \pm 0,2$  grados  $2\theta$ .
2. La forma sólida de clorhidrato de bendamustina según la reivindicación 1, que produce un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende además una o más de las siguientes reflexiones: 17,5, 24,9 y  $28,3 \pm 0,2$  grados  $2\theta$ .
- 10 3. La forma sólida de clorhidrato de bendamustina según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que produce un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende además la reflexión  $8,349 \pm 0,2$  grados  $2\theta$ .
4. Una composición que comprende la forma sólida de clorhidrato de bendamustina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 5. Una composición que comprende la forma sólida de clorhidrato de bendamustina según la reivindicación 4, en la que la composición está sustancialmente libre de otras formas sólidas de clorhidrato de bendamustina.
- 20 6. La composición según la reivindicación 4 o 5 para su uso en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple o cáncer de mama.
7. La composición para su uso según la reivindicación 6, en la que el linfoma no Hodgkin es linfoma no Hodgkin indolente de linfocitos B.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65



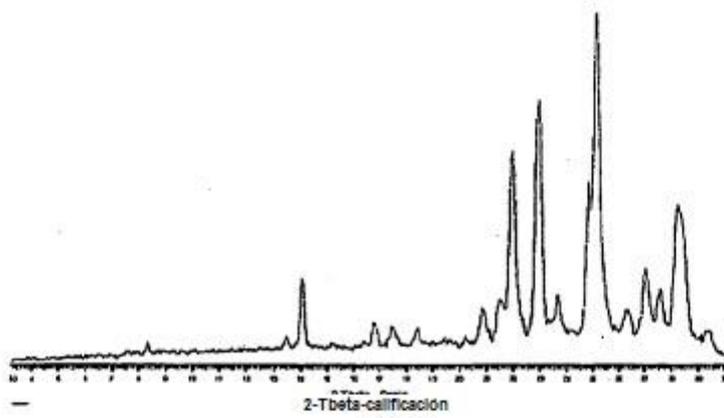


FIG. 2

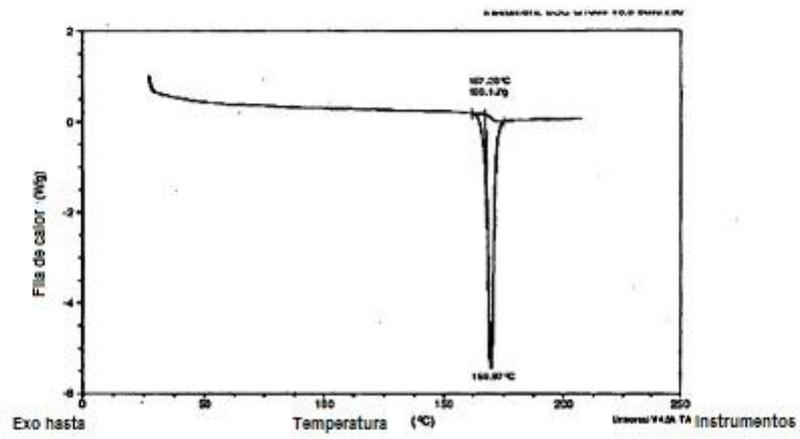


FIG. 3

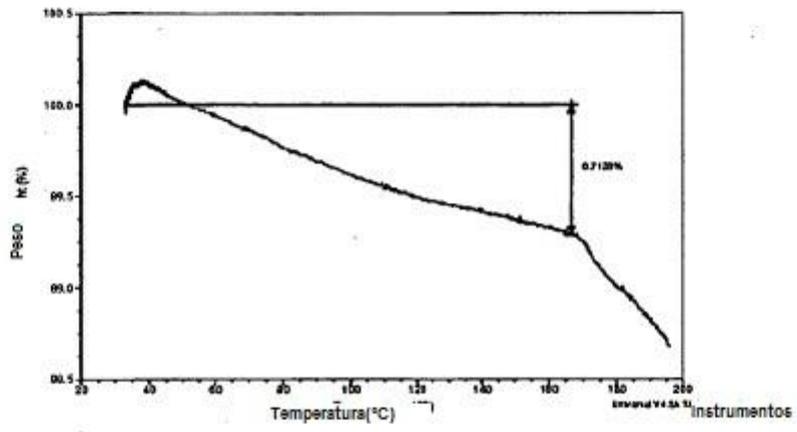


FIG. 4

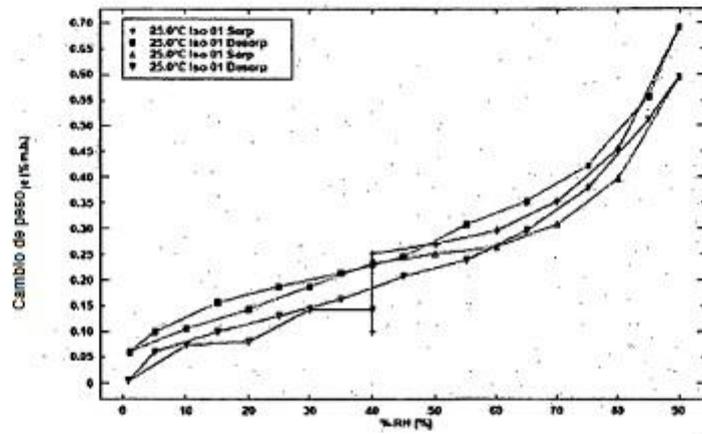


FIG. 5

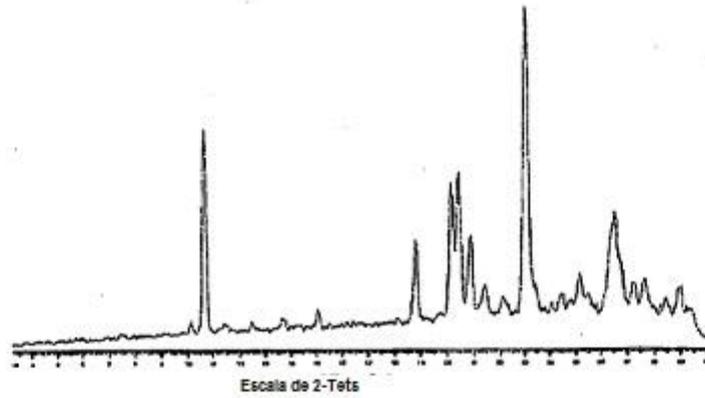


FIG. 6

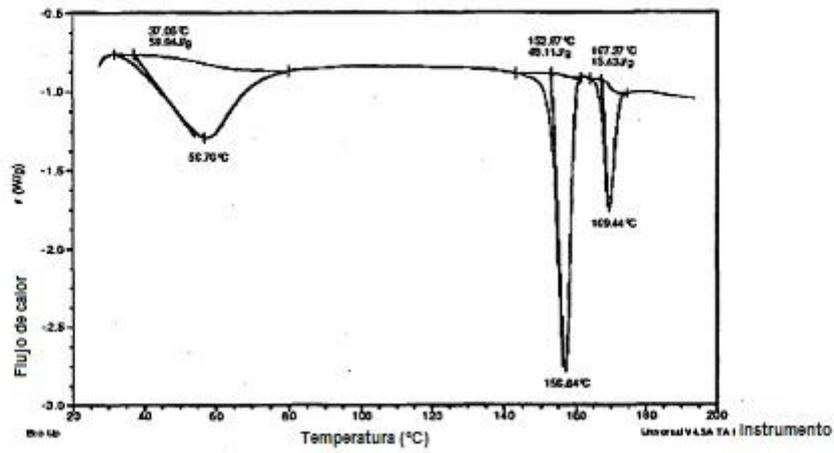


FIG. 7A

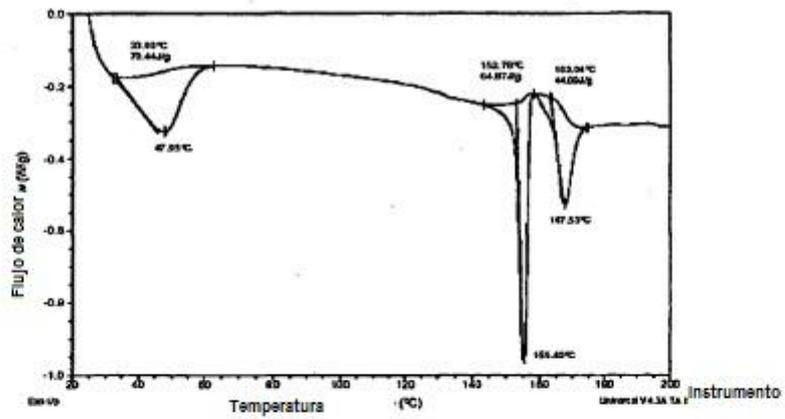


FIG. 7B

(2°C/minuto de calentamiento)

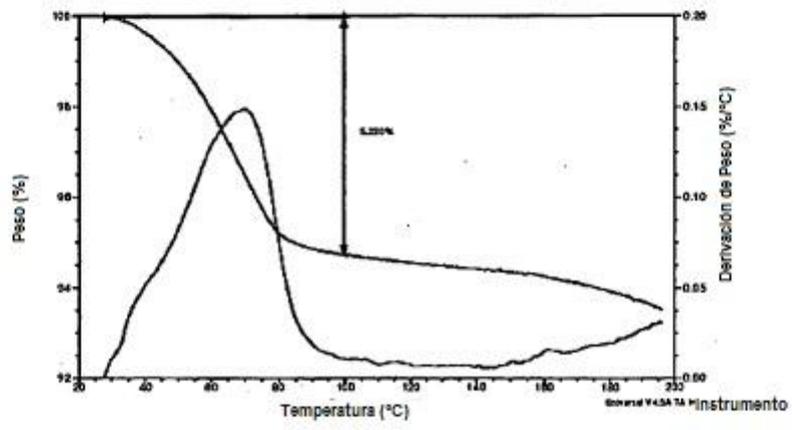


FIG. 8

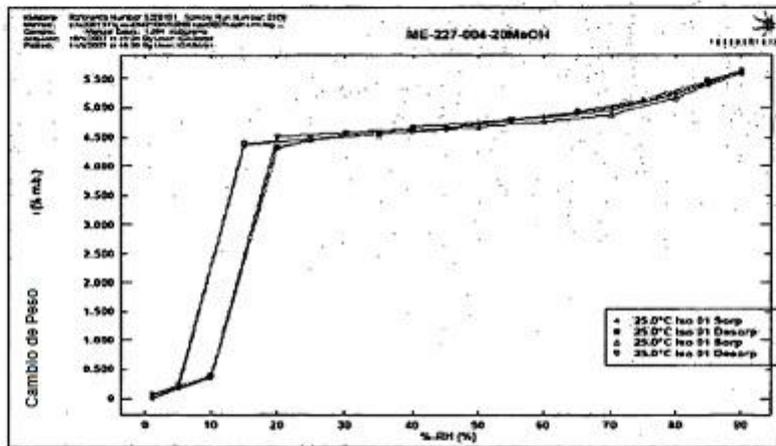
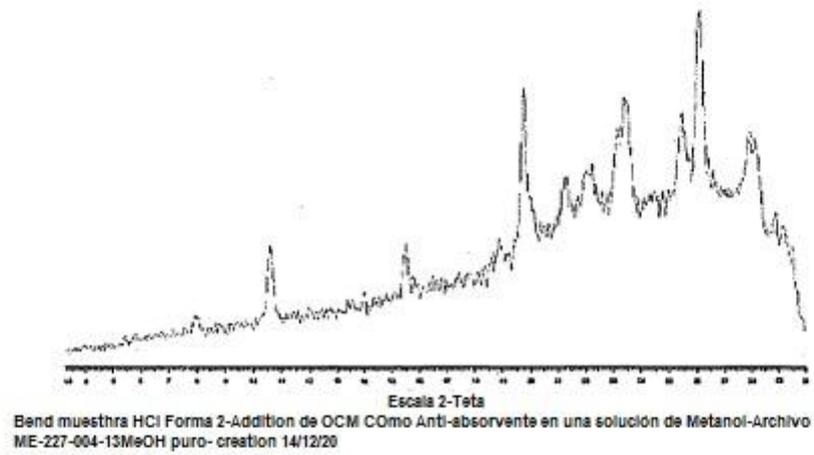
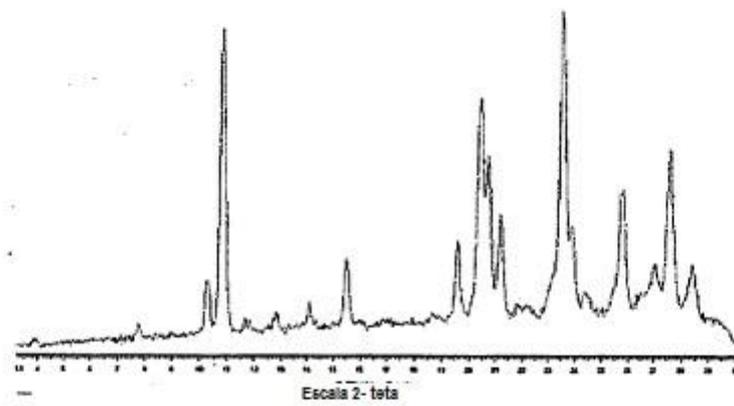


FIG. 9



**Fig. 10**



**FIG. 11**

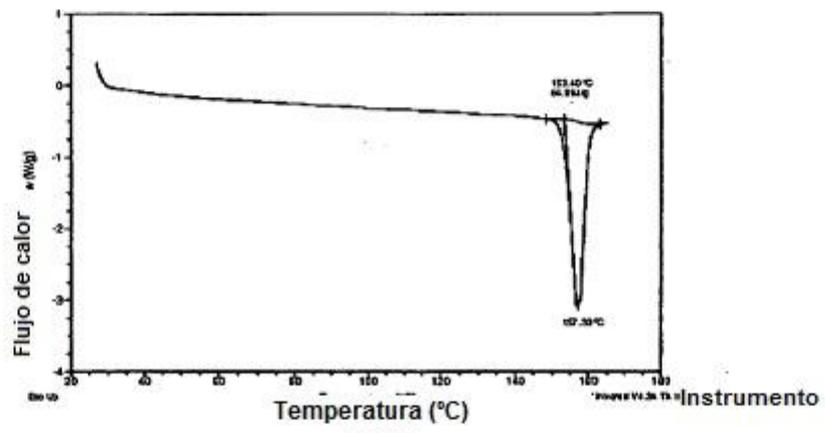


FIG. 12

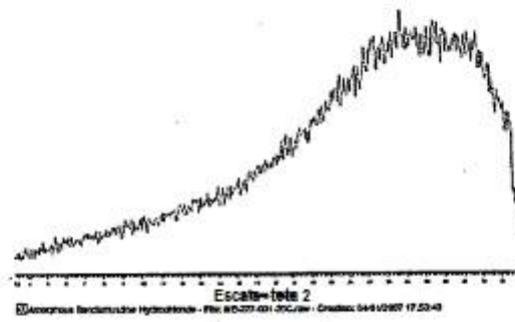


FIG. 13

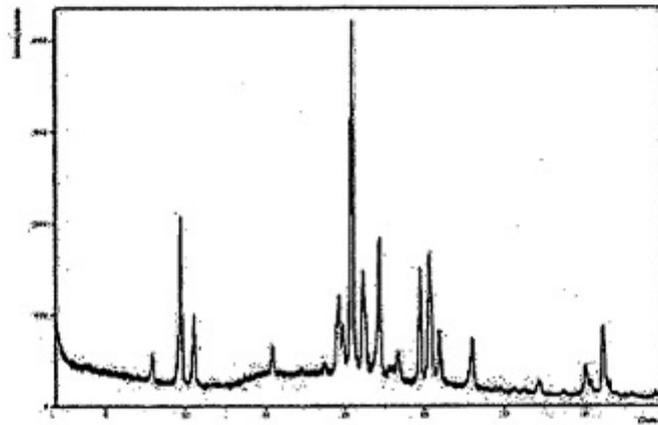


FIG. 14