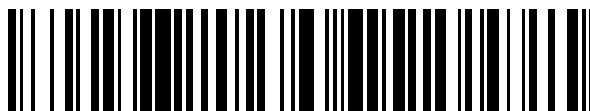


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 620**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/40** (2006.01)

**A61K 31/4184** (2006.01)

**A61K 47/42** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2010** **E 14177306 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018** **EP 2792369**

54 Título: **Composiciones de ciclopolisacárido y de bendamustina**

30 Prioridad:

**25.02.2009 US 208541 P**

**01.07.2009 US 269944 P**

**20.07.2009 US 271364 P**

**19.10.2009 US 279293 P**

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

**11.07.2018**

73 Titular/es:

**SOFTKEMO PHARMA CORP. (100.0%)**

**1080 Côte du Beaver Hall, Suite 1610**

**Montreal, QC H2Z 1S8, CA**

72 Inventor/es:

**POPEK, TOMASZ;**

**PATEL, KISHORE;**

**ALAKHOV, VALERY y**

**PIETRZYNSKI, GRZEGORZ**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 675 620 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 de ciclopolisacárido y de bendamustina

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones de (a) bendamustina, (b) un ciclopolisacárido cargado.

### 10 **Antecedentes de la invención**

La bendamustina, el ácido 4-[5-[bis(2-cloroetil)amino]-1-metilbencimidazol-2-il]butanoico, se utiliza en el tratamiento de la leucemia y de ciertos linfomas. Sin embargo, este compuesto presenta una estabilidad química limitada en plasma, requiriendo de ese modo unas dosis elevadas o repetidas a fin de lograr un efecto terapéutico. De este modo, existe la necesidad de formulaciones de este fármaco que muestren una mayor estabilidad.

Se ha intentado incrementar la estabilidad de bendamustina complejando tal molécula con materiales poliméricos. Sin embargo, los enfoques adoptados sólo lograron un éxito marginal. De este modo, Pencheva et al; "HPLC study on the stability of bendamustine hydrochloride immobilized onto polyphosphoesters"; J. Pharma. Biomed. Anal; (2008), intentaron mejorar la estabilidad de bendamustina complejando tal compuesto con polifosfoésteres. Sin embargo, la figura 2 de dicho artículo muestra que incluso el complejo más estable disminuye mediante un registro de puntos completo (90%) en aproximadamente 45 minutos a pH 7.

En cierto modo de forma similar, Evjen; "Development of Improved Bendamustin-Liposomes"; Masters Thesis; University of Tromso (2007), utilizó una centrifugación asimétrica dual para incorporar bendamustina en liposomas. Según la Tabla 18 (en la página 79), estas formulaciones sólo proporcionan un incremento marginal de la estabilidad con respecto a bendamustina libre (semivida de 20 minutos frente a semivida de 14 minutos para bendamustina libre cuando se dispersa en un medio de cultivo celular).

En consecuencia, existe la necesidad de formulaciones mejoradas de bendamustina que proporcionarán una estabilidad potenciada en disoluciones acuosas, particularmente plasma.

### 30 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a una composición que comprende: (a) bendamustina, (b) un ciclopolisacárido cargado, y (c) un agente estabilizante; presentando preferentemente un agente estabilizante una carga opuesta a la del ciclopolisacárido. Dicha composición proporciona una estabilidad inesperadamente deseable en entornos reactivos tales como plasma, acoplado con una actividad anticancerosa inesperadamente deseable. Dicha composición es adecuada para inyección o infusión en pacientes que necesiten tratamiento con bendamustina.

### 40 **Descripción detallada**

La presente invención se refiere a una composición que comprende: (a) bendamustina, (b) un ciclopolisacárido cargado. Preferentemente, la proporción de principio activo a ciclopolisacárido, en peso, se encuentra entre aproximadamente 1:12.500 y aproximadamente 1:25; está más preferentemente entre aproximadamente 1:5.000 y aproximadamente 1:50; incluso está más preferentemente entre aproximadamente 1:2.500 y aproximadamente 1:75, y todavía más preferentemente entre aproximadamente 1:1.500 y 1:100.

### 50 **Ciclopolisacáridos**

El ciclopolisacárido utilizado en la puesta en práctica de la presente invención es la sulfobutil éter beta-ciclodextrina.

### **Agentes estabilizantes catiónicos**

En las formas de realización en las que el ciclopolisacárido se modifica con grupos aniónicos, el agente estabilizante se selecciona de agentes catiónicos, o de compuestos policatiónicos. Los agentes catiónicos que se pueden utilizar incluyen aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias o compuestos de amonio cuaternario, tales como N-alkuil-N,N-dimetilaminas, N-alkuil-N,N-dietilaminas, N-alkuil-N,N-dietanolaminas, N-alkuilmorfolina, N-alkuilpiperidina, N-alkuilpirrolidina, N-alkuil-N,N,N-trimetilamonio, N,N-dialquil-N,N-dimetilamonio, N-alkuil-N-bencil-N,N-dimetilamonio, N-alkuil-piridinio, N-alkuil-picolinio, alquilamidometilpiridinio, carbalcoxipiridinio, N-alkuilquinolinio, N-alkuilisoquinolinio, N,N-alkuilmetilpirrolidinio, y 1-alkuil-2,3-dimetilimidazolio. Los adyuvantes catiónicos particularmente preferidos incluyen aminas terciarias estéricamente impedidas, tales como N-alkuil-N,N-diisopropilamina, N-alkuilmorfolina, N-alkuilpiperidina, y N-alkuilpirrolidina; y compuestos de amonio cuaternario tales como cloruro de cetilpiridinio, cloruro de bencildimetildodecilamonio, cloruro de dodecilpiridinio, cloruro de hexadeciltrimetilamonio, cloruro de bencildimetiltetradecilamonio, cloruro de octadecilmetilbencilamonio, y bromuro de domifeno.

También se pueden utilizar como el agente estabilizante compuestos policatiónicos tales como oligo- o poliaminas, u oligo- o poliaminas pegiladas. Los compuestos policatiónicos preferidos incluyen oligoaminas tales como espermina, espermidina, putrescina, y cadaverina; poliaminas: tales como polietilenimina, poliespermina, poliputrescina, y policadaverina; y oligoaminas y poliaminas pegiladas del grupo enumerado anteriormente. Se prefiere particularmente PI2080, polietilenimina 2000 conjugada con PEG 8000.

Una clase preferida de agentes estabilizantes catiónicos son polipéptidos que comprenden de aproximadamente 5 a aproximadamente 50, más preferentemente entre aproximadamente 6 y aproximadamente 20 aminoácidos; en los que al menos aproximadamente 50% de tales aminoácidos contienen una carga positiva. Todavía más preferentemente, tal aminoácido cargado es arginina. Los miembros particularmente preferidos de esta clase de péptidos incluyen péptidos ricos en arginina que comprenden al menos una secuencia de bloques de 4 argininas. Otro miembro particularmente preferido de esta clase de péptidos es protamina, que se ha digerido con termolisina (en adelante denominada como protamina de bajo peso molecular o "LMWP").

También se pueden utilizar oligo- o poliaminas modificadas hidrófobamente. El agente estabilizante preferido de este tipo incluye acetil espermina, acetil poliespermina, acetil polietilenimina, butiril espermina, butiril poliespermina, butiril polietilenimina, lauroil espermina, lauroil poliespermina, lauroil polietilenimina, estearoil espermina, estearoil poliespermina, y estearoil polietilenimina.

Además, también se pueden utilizar polisacáridos catiónicos y polímeros policatiónicos sintéticos. Son ilustrativos de tales polisacáridos catiónicos quitosano, quitosano desacetilado, celulosa cuaternizada, amilosa cuaternizada, amilopectina cuaternizada, celulosa cuaternizada parcialmente hidrolizada, amilosa cuaternizada parcialmente hidrolizada, y amilopectina cuaternizada parcialmente hidrolizada. Ilustrativos de tales polímeros policatiónicos sintéticos son Polyquaternium 2 (poli[bis(2-cloroetil)eter-alt-1,3-bis[3-dimetilamino]propil]-urea cuaternizada); Polyquaternium 11 (poli(1-vinilpirrolidona-co-metacrilato de dimetilaminoetilo) cuaternizado); Polyquaternium 16 y 44 (copolímero de vinilpirrolidona y vinilimidazol cuaternizado); y Polyquaternium 46 (copolímero de vinilcaprolactama, vinilpirrolidona y vinilimidazol cuaternizado).

#### **Agentes estabilizantes aniónicos**

En las formas de realización en las que el ciclopolisacárido se modifica con grupos catiónicos, el agente estabilizante se selecciona de agentes aniónicos, o de polímeros polianiónicos.

Preferiblemente, tal agente aniónico se selecciona de compuestos que comprenden un grupo carboxi, sulfato, sulfono, fosfato, o fosfono.

Una clase de agentes aniónicos que se puede utilizar son tensioactivos aniónicos tales como 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato de sodio, N-lauroilsarcosinato de sodio, dodecilsulfato de sodio, dodecilsulfato de sodio, y similares.

También se pueden utilizar como el agente estabilizante polisacáridos catiónicos. Son ilustrativos de tales compuestos sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, kappa-carrageenano, iota-carrageenano, lambda-carrageenano, mu-carrageenano, xi-carrageenano, psi-carrageenano, tau-carrageenano, furcellarano, sulfato de heparano, queratina, fucoidano, ácido hialurónico, ácido algínico, poli(sulfonilbutilo)celulosa, poli(sulfonilpropilo)celulosa, poli(sulfonilpropilo)dextrano, poli(sulfonilbutilo)dextrano, poli(sulfonilbutilo)amilasa y poli(sulfonilpropilo)amilasa.

El agente estabilizante también puede ser un polímero polianiónico seleccionado de poliacrilatos, polimetacrilatos, y sus copolímeros.

#### **Excipientes**

Las composiciones de esta invención pueden contener además excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como azúcares, polialcoholes, polímeros solubles, sales y lípidos.

Los azúcares y polialcoholes que se pueden utilizar comprenden de manera no limitativa lactosa, sacarosa, manitol, y sorbitol.

Ilustrativos de los polímeros solubles que se pueden utilizar son polioxietileno, poloxámeros, polivinilpirrolidona, y dextrano.

Las sales útiles comprenden de manera no limitativa cloruro de sodio, cloruro de magnesio, y cloruro de calcio.

Los lípidos que se pueden emplear comprenden de manera no limitativa ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos con glicerol, glicolípidos, y fosfolípidos.

## Preparación

La composición de la invención se puede preparar mediante la disolución de bendamustina sólida en una disolución acuosa del ciclopolisacárido; o mezclando una disolución acuosa del ciclopolisacárido con una disolución madre acuosa de bendamustina. Tal mezcla resultante se mezcla vigorosamente y se somete opcionalmente a la acción de ondas de ultrasonidos para obtener una disolución acuosa homogénea y equilibrada. Cuando el ciclopolisacárido es una ciclodextrina, se prefiere que la disolución acuosa de ciclodextrina usada para la preparación de composición contenga al menos 4% de ciclodextrina; más preferentemente, tal disolución contiene al menos 10% de ciclodextrina.

El agente estabilizante y el excipiente (si está presente) se introducen preferentemente a la composición mediante su adición a una disolución homogénea y equilibrada acuosa previamente preparada de bendamustina con ciclopolisacárido. Tales agentes se pueden añadir como sustancias puras o como disoluciones acuosas, y se mezclan preferentemente utilizando agitación suave.

Preferiblemente, la composición final se filtra antes de la utilización para inyección.

La composición se puede liofilizar opcionalmente para producir un material sólido adecuado para disolución en medios de inyección antes de su uso. Se prefiere que las composiciones que comprenden aminos como agentes estabilizantes se liofilicen antes de la adición de tal agente estabilizante, introduciéndose tal agente en la composición tras la reconstitución, poco antes de su uso.

En una forma de realización, la composición de la invención se prepara mezclando los componentes e incubando.

En otra forma de realización, la composición de esta invención se prepara mezclando los componentes y aplicando ultrasonidos a la mezcla.

En otra forma de realización, la composición de esta invención se prepara mezclando los componentes, incubando, y liofilizando el producto.

En una forma de realización preferida, la composición de esta invención se prepara mezclando los componentes, aplicando ultrasonidos a la mezcla, y liofilizando el producto.

Las composiciones de esta invención demuestran estabilidad potenciada en disolución acuosa y cuando se introducen en plasma, tanto en condiciones *in vitro* como en condiciones *in vivo*. De este modo, tales formulaciones mostrarán una semivida en plasma que es mayor que la de bendamustina no formulada, semivida la cual se puede prolongar en más de 50%, y preferentemente más de 100%.

Además, las composiciones de esta invención muestran actividad inesperadamente mejorada frente a tumores con respecto a composiciones que comprenden bendamustina y un ciclopolisacárido, así como también con respecto a bendamustina sola.

## Ejemplos

### 45 **Ejemplo 1. Preparación de composición de bendamustina con sulfobutil éter $\beta$ -ciclodextrina sódica y condroitina**

Se disolvieron 6 mg de hidrocloreuro de bendamustina en 1 ml de disolución al 20% p/p de sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica. La disolución se incubó a 20°C durante 15 minutos en baño ultrasónico y se mezcló con 1 ml de disolución de sulfato de condroitina al 25%.

### **Ejemplo 2. Preparación de una composición de bendamustina con sulfobutil éter $\beta$ -ciclodextrina sódica y poli(sulfonilbutilo)celulosa.**

Se disuelven 6 mg de hidrocloreuro de bendamustina en 1 ml de disolución al 30% p/p de sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica. La disolución se preincuba a 10°C durante 15 minutos en baño ultrasónico. Después de eso, la disolución se mezcla con 1 ml de disolución al 2% de sal sódica de poli(sulfonilbutilo)celulosa. La muestra se incubó en baño ultrasónico durante 30 minutos a 10°C.

### 60 **Ejemplo 3. Preparación de una composición de bendamustina con sulfobutil éter $\beta$ -ciclodextrina sódica y ácido hialurónico.**

Se disolvieron 6 mg de hidrocloreuro de bendamustina en 1 ml de disolución al 30% p/p de sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica. La disolución se preincubó a 10°C durante 15 minutos en baño ultrasónico. Después de eso, la

disolución se mezcló con 1 ml de disolución al 0,1% de sal sódica del ácido hialurónico. La muestra se incubó en un baño ultrasónico durante 30 minutos a 10°C.

**Ejemplo 4. Preparación de una composición de bendamustina con sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica y dextrano.**

Se disolvieron 6 mg de hidrocloreto de bendamustina en 1 ml de disolución al 20% p/p de sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica. La disolución se incubó a 20°C durante 15 minutos en baño ultrasónico, y después se mezcló con 1 ml de disolución al 50% de dextrano 40 (MW 40000) y se sometió a ultrasonidos durante otros 15 minutos.

**Ejemplo 5. Preparación de una composición de bendamustina con 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina y dextrano.**

Se disolvieron 6 mg de hidrocloreto de bendamustina en 1 ml de disolución al 20% p/p de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina. La disolución se incubó a 20°C durante 15 minutos en baño ultrasónico, y después se mezcló con 1 ml de disolución al 50% de dextrano 40 (MW 40000) y se sometió a ultrasonidos durante otros 15 minutos.

**Ejemplo 6. Preparación de una composición de bendamustina con sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica y celulosa cuaternizada.**

Se disolvieron 2 mg de celulosa cuaternizada (sal de hidrocloreto) en 1 ml de agua. Después de 4 horas de preincubación en un baño ultrasónico (a temperatura ambiente), la disolución se mezcló con una disolución de 6 mg de hidrocloreto de bendamustina en 1 ml de disolución al 20% p/p de sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica. La disolución se mezcló bien y se incubó durante 15 minutos en baño ultrasónico.

**Ejemplo 7. Preparación de una composición de bendamustina con sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica y polivinilpirrolidona.**

Se disolvieron 6 mg de hidrocloreto de bendamustina en 1 ml de disolución al 30% p/p de sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica. La disolución se incubó a 20°C durante 15 minutos en un baño ultrasónico, y después se mezcló con 1 ml de disolución al 20% de PVP (MW = 10000) y se sometió a ultrasonidos durante 20 minutos.

**Ejemplo 8. Preparación de una composición de bendamustina con sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica y cloruro de cetilpiridinio.**

Se disolvieron 6 mg de hidrocloreto de bendamustina y 8,5 mg de manitol en 0,8 g de disolución al 50% p/p de sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica. La disolución se incubó a 20°C durante 15 minutos en baño ultrasónico, y después se mezcló con 0,2 ml de disolución al 2,5% de cloruro de cetilpiridinio.

**Ejemplo 9. Preparación de composición de bendamustina con sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica y PI2080.**

Preparación de PI2080

Polietilenimina (PEI, MW 2000) se adquirió de Aldrich. El éter monometílico de poli(etilenglicol) (PEG, MW 8500) se adquirió de Polymer Sources Inc.

PI2080, un conjugado de PEG y PEI, se preparó siguiendo el procedimiento descrito por Vinogradov S. V. et al. en Bioconjugate Chem. 1998, 9, 805-812. Se hicieron reaccionar 4 g de PEG con 1,1'-carbonildiimidazol en 20 ml de acetonitrilo anhidro. El producto de la reacción se dializó dos veces frente a agua usando una membrana SpectraPor 3, MWCO 3500, y se liofilizó. El material liofilizado se disolvió en 32 ml de metanol, se mezcló con 2,9 g de PEI, y se incubó durante 24 horas a 25°C. El producto se dializó dos veces frente a agua usando la membrana SpectraPor 3, MWCO 3500, y el producto PI2080 se liofilizó.

Preparación de composición de bendamustina con sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica y PI2080.

Se disolvieron 2,5 mg de hidrocloreto de bendamustina y 4,3 mg de manitol en 0,8 g de disolución al 50% p/p de sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica. La disolución se incubó a 20°C durante 15 minutos en baño ultrasónico, y después se mezcló con 0,2 ml de disolución al 5% de PI2080.

**Ejemplo 10. Preparación de bendamustina composición con sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica y con sulfato de protamina.**

Se disolvieron 2,5 mg de hidrocloreto de bendamustina y 4,3 mg de manitol en 0,800 g de disolución al 50% p/p de sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica. La disolución se agitó a 20°C durante 90 minutos y después se incubó durante 30 minutos en un baño ultrasónico. Después, la mezcla se transfirió a una suspensión de 30 mg de sulfato de protamina en 0,163 g de agua y se mezcló vigorosamente durante 15 minutos.

**Ejemplo 11. Farmacocinética de bendamustina dosificada a ratas en composición con sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica y cloruro de cetilpiridinio.**

5 Composiciones ensayadas:

Control: 6 mg/ml de hidrocloreuro de bendamustina, 10,2 mg/ml de manitol en NaCl al 0,9%; dosis de 20 mg/kg

10 Composición de la invención: 5 mg/g de hidrocloreuro de bendamustina, 40% p/p de sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica, 0,5% de cloruro de cetilpiridinio, 8,5 mg/g de manitol en agua (producida según el procedimiento del Ejemplo 8); dosis de 20 mg/kg.

Animales:

15 Ratas hembra Sprague-Dawley (250-350 g). Los animales se mantuvieron tres por jaula con una cubierta de filtro de aire bajo luz (ciclo de 12 h de luz/oscuridad, la luz se enciende a 06h00) y temperatura controlada 22°C +/- 1°C. Todas las manipulaciones con los animales se realizaron bajo una campana laminar esterilizada. Los animales tuvieron acceso a voluntad a comida Purina para ratones y agua. Los animales se dejaron en ayunas durante toda la noche y se anestesiaron, antes de la dosificación.

20 Dosificación y toma de muestras:

25 La composición de bendamustina de la invención y el control se administraron intravenosamente a ratas en la vena de la cola. Después de intervalos de tiempo de 5, 15, 30, 45 min., 1, 1,5, 2 y 3 h tras la inyección, se recogieron muestras de sangre. Las ratas se anestesiaron mediante inhalación general de isoflurano. Las muestras de sangre se recogieron de la vena yugular con tubo heparinizado, y se mantuvieron en hielo. La sangre se centrifugó inmediatamente, y se separó el plasma. Las muestras de plasma se extrajeron inmediatamente.

30 Extracción y análisis de las muestras:

35 Las muestras de plasma de 0,100 ml se transfirieron a tubos de plástico. Las muestras se extrajeron con 0,400 ml de HCl 100 mM en acetonitrilo mientras se agitaban vigorosamente durante 30 segundos. Las muestras se centrifugaron a 10000 RPM durante 5 minutos. Se separó el sobrenadante. Las muestras se congelaron en hielo seco y se mantuvieron a -80°C hasta el análisis mediante HPLC. Se inyectaron alícuotas de 20 microlitros en el HPLC para el análisis.

Condiciones de HPLC:

40 Columna de fase inversa C18 50 x 4,6 mm, Symmetry/Shield 3,5 micrómetros

Temperatura de la columna 30°C

Caudal 1,5 ml/min.

45 Volumen de inyección 20 microlitros

Detección de la fluorescencia a longitudes de onda: excitación 327 nm, emisión 420 nm

50 Fase móvil: Tampón A: 5% de acetonitrilo 0,1% de TFA

Tampón B: 90% de acetonitrilo 0,1% de TFA

Tiempo del experimento: 10 min.

55 En la Tabla 1 a continuación se muestran los perfiles farmacocinéticos mejorados de bendamustina para la composición ensayada frente al control.

Tabla 1. Concentración de bendamustina en plasma de rata frente a tiempo tras la inyección

Tiempo [horas]	Control [ng/ml]	Composición de la invención [ng/ml]
	Media (SEM)	Media (SEM)
0,08	12304 (2498)	16721 (1981)
0,25	7625 (536)	10713 (1458)
0,5	3046 (260)	4855 (874)
0,75	966 (192)	2165 (101)

Tiempo [horas]	Control [ng/ml]	Composición de la invención [ng/ml]
	Media (SEM)	Media (SEM)
1	414 (143)	1108 (104)
1,5	133 (80)	418 (57)
2	54 (34)	197 (25)
3	9 (6)	57 (24)

SEM – error estándar de la media

Los datos anteriores muestran que la estabilidad de bendamustina en plasma está enormemente incrementada en las composiciones inventivas de esta invención.

5 **Ejemplo 12. Farmacocinética de bendamustina dosificada a ratas en composición con sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica y PI2080.**

Composiciones ensayadas:

10 Control: 2,5 mg/ml de hidrocloreuro de bendamustina, 4,25 mg/ml de manitol en NaCl al 0,9%; dosis de 10 mg/kg

15 Composición de la invención: 2,5 mg/ml de hidrocloreuro de bendamustina, 40% p/p de sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica, 1% de PI2080, 4,3 mg/g de manitol en agua (producida según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 9); dosis de 10 mg/kg.

Animales:

20 Ratas hembra Sprague-Dawley (250-350 g). Los animales se mantuvieron tres por jaula con una cubierta de filtro de aire bajo luz (ciclo de 12 h de luz/oscuridad, la luz se enciende a 06h00) y temperatura controlada 22°C +/- 1°C. Todas las manipulaciones con los animales se realizaron bajo una campana laminar esterilizada. Los animales tuvieron acceso a voluntad a comida Purina para ratones y agua. Los animales se dejaron en ayunas durante toda la noche y se anestesiaron, antes de la dosificación.

25 Dosificación y toma de muestras:

30 La composición de bendamustina de la invención y el control se administraron intravenosamente a ratas en la vena de la cola. Se recogieron muestras de sangre después de intervalos de tiempo de 5, 15, 30, 45 min., 1, 1,5, 2 y 3 h tras la inyección. Las ratas se anestesiaron mediante inhalación general de isoflurano. Las muestras de sangre se recogieron de la vena yugular con tubo heparinizado, y se mantuvieron en hielo. La sangre se centrifugó inmediatamente, y se separó el plasma. Las muestras de plasma se extrajeron inmediatamente.

35 Extracción y análisis de las muestras:

40 Las muestras de plasma de 0,100 ml se transfirieron a tubos de plástico. Las muestras se extrajeron con 0,400 ml de HCl 100 mM en acetonitrilo mientras se agitaban vigorosamente durante 30 segundos. Las muestras se centrifugaron a 10000 RPM durante 5 minutos. Se separó el sobrenadante. Las muestras se congelaron en hielo seco y se mantuvieron a -80°C hasta el análisis mediante HPLC. Se inyectaron alícuotas de 20 microlitros en el HPLC para el análisis.

Condiciones de HPLC:

45 Columna de fase inversa C18 50 x 4,6 mm, Symmetry/Shield 3,5 micrómetros

Temperatura de la columna 30°C

Caudal 1,5 ml/min.

50 Volumen de inyección 20 microlitros

Detección de la fluorescencia a longitudes de onda: excitación 327 nm, emisión 420 nm

55 Fase móvil: Tampón A: 5% de acetonitrilo 0,1% de TFA

Tampón B: 90% de acetonitrilo 0,1% de TFA

Tiempo del experimento: 10 min.

En la Tabla 2 a continuación se muestran los perfiles farmacocinéticos mejorados de bendamustina para la composición ensayada frente al control.

5 Tabla 2. Concentración de bendamustina en plasma de rata frente a tiempo tras la inyección

Tiempo [horas]	Control [ng/ml]	Composición de la invención [ng/ml]
	Media (SEM)	Media (SEM)
0,08	6045 (388)	6124 (508)
0,25	2428 (250)	2814 (392)
0,5	520 (105)	1234 (92)
0,75	145 (35)	549 (95)
1	48 (11)	314 (118)
1,5	8 (1)	188 (97)
2	2 (1)	118 (60)
3	0 (1)	48 (23)

SEM – error estándar de la media

Los datos anteriores muestran que la estabilidad de bendamustina en plasma está enormemente incrementada en las composiciones inventivas de la presente invención.

10 **Ejemplo 13. Farmacocinética de bendamustina dosificada a ratas en composición con sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica y sulfato de protamina.**

Composiciones ensayadas:

15 Control: 2,5 mg/ml de hidrocloreuro de bendamustina, 4,25 mg/ml de manitol en NaCl al 0,9%; dosis de 10 mg/kg

20 Composición de la invención: 2,5 mg/ml de hidrocloreuro de bendamustina, 40% p/p de sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica, 3% de sulfato de protamina, 4,3 mg/g de manitol en agua (producida según el procedimiento descrito en el Ejemplo 10); dosis de 10 mg/kg.

Animales:

25 Ratas hembra Sprague-Dawley (250-350 g). Los animales se mantuvieron tres por jaula con una cubierta de filtro de aire bajo luz (ciclo de 12 h de luz/oscuridad, la luz se enciende a 06h00) y temperatura controlada 22°C +/- 1°C. Todas las manipulaciones con los animales se realizaron bajo una campana laminar esterilizada. Los animales tuvieron acceso a voluntad a comida Purina para ratones y agua. Los animales se dejaron en ayunas durante toda la noche y se anestesiaron, antes de la dosificación.

30 Dosificación y toma de muestras:

35 La composición de bendamustina de la invención y el control se administraron intravenosamente a ratas en la vena de la cola. Después de intervalos de tiempo de 5, 15, 30, 45 min., 1, 1,5, 2 y 3 h tras la inyección, se recogieron muestras de sangre. Las ratas se anestesiaron mediante inhalación general de isoflurano. Las muestras de sangre se recogieron de la vena yugular con tubo heparinizado, y se mantuvieron en hielo. La sangre se centrifugó inmediatamente, y se separó el plasma.

40 Las muestras de plasma se extrajeron inmediatamente.

Extracción y análisis de las muestras:

45 Las muestras de plasma de 0,100 ml se transfirieron a tubos de plástico. Las muestras se extrajeron con 0,400 ml de HCl 100 mM en acetonitrilo mientras se agitaban vigorosamente durante 30 segundos. Las muestras se centrifugaron a 10000 RPM durante 5 minutos. Se separó el sobrenadante. Las muestras se congelaron en hielo seco y se mantuvieron a -80°C hasta el análisis mediante HPLC. Se inyectaron alícuotas de 20 microlitros en el HPLC para el análisis.

Condiciones de HPLC:

50 Columna de fase inversa C18 50 x 4,6 mm, Symmetry/Shield 3,5 micrómetros

Temperatura de la columna 30°C



Caudal 1,5 ml/min.

Volumen de inyección 20 microlitros

5 Detección de la fluorescencia a longitudes de onda: excitación 327 nm, emisión 420 nm

Fase móvil: Tampón A: 5% de acetonitrilo 0,1% de TFA

10 Tampón B: 90% de acetonitrilo 0,1% de TFA

Tiempo del experimento: 10 min.

En la Tabla 3 a continuación se muestran los perfiles farmacocinéticos mejorados de bendamustina para la composición ensayada frente al control.

15

Tabla 3. Concentración de bendamustina en plasma de rata frente a tiempo tras la inyección

Tiempo [horas]	Control [ng/ml]	Composición de la invención [ng/ml]
	Media (SEM)	Media (SEM)
0,08	6045 (388)	3853 (787)
0,25	2428 (250)	2416(716)
0,5	520 (105)	1100 (313)
0,75	145 (35)	595 (154)
1	48(11)	415 (140)
1,5	8 (1)	139 (20)
2	2 (1)	126 (36)
3	0 (0)	47 (18)
4		19 (9)

SEM – error estándar de la media

20 Los datos anteriores muestran que la estabilidad de la composición de ciclopilisacárido está enormemente incrementada cuando se compara con la de bendamustina sola.

**Ejemplo 14. Preparación de composición de bendamustina con sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica y Luviquat FC370.**

25 Se disolvieron 6 mg de hidrocloreuro de bendamustina en 1 ml de disolución al 30% p/p de sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica. La disolución se preincubó a 10°C durante 15 minutos en baño ultrasónico; y después se mezcló con 1 ml de disolución al 0,1% de Luviquat FC370.

30 Luviquat FC370 (Poliquaternium-16) es un copolímero de vinilpirrolidona y vinilimidazol cuaternizado (CAS n° 95144-24-4 (BASF). La muestra se incubó en un baño ultrasónico durante 30 minutos a 10°C.

**Ejemplo 15. Preparación de composición de bendamustina con sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica y Luviquat HOLD.**

35 Se disolvieron 6 mg de hidrocloreuro de bendamustina en 1 ml de disolución al 30% p/p de sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica. La disolución se preincubó a 10°C durante 20 minutos en un baño ultrasónico; y después se mezcló con 1 ml de disolución al 0,15% de Luviquat HOLD. Luviquat HOLD (Poliquaternium-46) es 1H-imidazolio, 1-etenil-3-metil-, sulfato de metilo, polímero con 1-etenilhexahidro-2H-azepin-2-ona y 1-etenil-2-pirrolidinona, CAS n° 174761-16-1, (BASF). La muestra se incubó en un baño ultrasónico durante 30 minutos a 10°C.

40

**Ejemplo 16. Preparación de composición de bendamustina con sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica y poli(vinilpirrolidona-co-metacrilato de 2-dimetilaminoetilo) cuaternizado.**

45 Se disolvieron 6 mg de hidrocloreuro de bendamustina en 1 ml de disolución al 30% p/p de sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica. La disolución se preincubó a 10°C durante 15 minutos en un baño ultrasónico. Después de eso, la disolución se mezcló con 1 ml de disolución al 0,1% de poli(vinilpirrolidona-co-metacrilato de 2-dimetilaminoetilo) cuaternizado. La muestra se incubó en un baño ultrasónico durante 30 minutos a 10°C.

**Ejemplo 17 Preparación de una composición de bendamustina con sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica y poli(vinilpirrolidona-co-metacrilato de 2-dimetilaminoetilo) cuaternizado)**

50

Se disolvieron 6 mg de hidrocloreuro de bendamustina en 1 ml de disolución al 30% p/p de sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica. La disolución se preincubó a 10°C durante 15 minutos en un baño ultrasónico. Después de eso,

la disolución se mezcló con 1 ml de disolución al 0,1% de poli(vinilpirrolidona-co-metacrilato de 2-dimetilaminoetilo) cuaternizado. La muestra se incubó en un baño ultrasónico durante 30 minutos a 10°C.

**Ejemplo 18. Preparación de composición de bendamustina con sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica y quitosano.**

Se suspendieron 5 mg de quitosano de bajo peso en 5 ml de ácido clorhídrico 0,2M, y se mezclaron toda la noche. El contenido del vial se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,45 μm y se liofilizó. Al material liofilizado se añadieron 2 ml de una disolución al 30% p/p de sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica. La mezcla se incubó a 20°C durante 24 horas y se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,45 μm. Se usó 1 ml de dicha disolución para disolver 6 mg de hidrocloreto de bendamustina. La disolución se incubó a 10°C durante 20 minutos en un baño ultrasónico.

**Ejemplo 19. Preparación de composición de bendamustina con sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica y poli(bis(2-cloroetil)eter-alt-1,3-bis[3-dimetilamino]propil]-urea cuaternizada.**

Se disolvieron 6 mg de hidrocloreto de bendamustina en 1 ml de una disolución al 30% p/p de sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica. La disolución se preincubó a 10°C durante 15 minutos en un baño ultrasónico. Después de eso, la disolución se mezcló con 1 ml de una disolución al 0,05% de poli(bis(2-cloroetil)eter-alt-1,3-bis[3-dimetilamino]propil]-urea cuaternizada. La muestra se incubó en un baño ultrasónico durante 30 minutos a 10°C.

**Ejemplo 20**

a. Preparación de protamina de bajo peso molecular (LMWP)

Se disolvieron 2 g de sulfato de protamina en 70 ml de tampón de acetato de amonio 0,1 M, pH 7 para formar una disolución de sulfato de protamina. Se disolvieron 20 mg de termolisina en 10 ml de tampón Tris 50 mM, pH 7,4 para formar una disolución de termolisina. La disolución de termolisina se añadió a la disolución de sulfato de protamina, seguido de 70 microlitros de cloruro de calcio acuoso 1 M. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0,7 ml de disolución de EDTA 0,7 M a la mezcla. La mezcla se liofilizó. El material seco se redisolvió en ácido acético acuoso al 0,2%, 100 mg por 1 ml, y se filtró a través de un filtro de 0,22 micrómetros. Se inyectaron 5 ml de la disolución en una columna de RP-HPLC Vaydac 218TP152050, 5 x 25 cm. La muestra se eluyó con gradiente de etanol en agua que comprende 0,2% de ácido acético. La fracción que contiene el producto se recogió y se liofilizó.

b. Preparación de composición de Bendamustina con sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica ("SBECD") y protamina de bajo peso molecular ("LMWP")

Se mezclaron 400 mg de sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica con 0,600 ml de agua y se agitó hasta que se disolvieron completamente. A esta disolución se le añadieron 16 mg de hidrocloreto de bendamustina y 27,3 mg de manitol, y se agitó durante 90 minutos. Se disolvieron 20 mg de LMWP en 936,8 mg de agua, y se mezcló con la de disolución bendamustina. El producto se almacenó a 4°C. El producto evaluó para determinar el contenido de bendamustina usando cromatografía de RP-HPLC analítica según lo siguiente. Se separaron muestras de 10 μl usando una columna Waters SymmetryShield RP-18 3,5 μm (4,6 x 50 mm) al caudal de 1,5 ml/min. de gradiente de acetonitrilo-agua que contiene 0,1% de TFA. La detección de los picos se llevó a cabo por medio de detección de absorción de UV a 260 nm. El área del pico de bendamustina se usó para evaluar la velocidad de estabilidad del fármaco, por triplicado. El área bajo el pico de bendamustina después de 24 horas fue 101,8% del inicial (desviación estándar 2%).

**Ejemplo 21. Preparación de composición de bendamustina liofilizada con sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica y protamina de bajo peso molecular.**

La composición del Ejemplo 20 se liofilizó. El producto fue un sólido blanco amorfo, soluble en agua. El producto antes del uso se reconstituyó con 1,536 ml de agua.

**Ejemplo 22. Citotoxicidad de composiciones de bendamustina**

Se mantuvieron Células H460, RPMI8226, y MDA-MB-231 en un medio apropiado, que contiene 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos. 24 h después de cultivar en placas, bendamustina (BM); BM en presencia de 0,1% de sulfobutil éter β-ciclodextrina sódica (SBECD); y BM en presencia de 0,1% de SBECD y 0,002-0,005% de protamina de bajo peso molecular (LMWP) se añadieron en diferentes concentraciones a los cultivos celulares, y las células se hicieron crecer durante tres días. La citotoxicidad del fármaco se evaluó usando el procedimiento WST-1.

Se estimaron los valores de IC50 para bendamustina, bendamustina formulada en SBECD, y bendamustina formulada en SBECD/LMWP. La Tabla 4 muestra el incremento en la potencia de BM producido por la formulación

del fármaco en SBECD o SBECD/LMWP. Como una medida del cambio en la actividad citotóxica de BM, se calcularon las relaciones de IC50 de BM a IC50 de la formulación de BM en SBECD o de SBECD/LMWP. Para cada estirpe celular, estas relaciones representan promedios para 3-12 experimentos independientes.

5 Tabla 4. Incremento en la potencia de BM (IC50 de BM/IC50 de la formulación, en paréntesis el error estándar).

Composición	Estirpe celular		
	H460	RPMI8226	MDA-MB-231
BM	1,0	1,0	1,0
BM+SBECD	1,2 (0,2)	1,6 (0,1)	1,6 (0,5)
BM+SBECD+LMWP	1,9 (0,3)	2,5 (0,4)	2,2 (0,1)

10 La formulación de SBECD incrementó la potencia de BM, disminuyendo su IC50. La adición de LMWP a la formulación de SBECD disminuyó sustancialmente de forma adicional la IC50 de BM. En dos estirpes celulares, H460 y RPMI8226, el efecto de LMWP fue estadísticamente significativo,  $p = 0,036$  y  $0,018$ , respectivamente. En las células MDA-MB-231, los efectos de ambas formulaciones no fueron significativamente diferentes. Para estas tres estirpes celulares, la disminución promedio en IC50 de BM fue 1,5 y 2,2 veces para SBECD y SBECD/LMWP, respectivamente.

15 **Ejemplo 23. Citotoxicidad de composiciones de bendamustina preincubadas con medios.**

20 Se incubaron BM y la formulación de SBECD/LMWP (40 mg/ml de BM en 20% de SBECD, 1% de LMWP) en un medio DMEM que contiene 10% de FBS durante 0, 1, o 4 h, y después se añadieron en concentraciones variables a células RPMI8226. Durante el tratamiento con BM, las concentraciones de SBECD y LMWP se mantuvieron constantes en el medio de cultivo a 0,1 y 0,05%, respectivamente. Las células se hicieron crecer entonces durante 72 h. La citotoxicidad del fármaco se evaluó usando el procedimiento WST-1. Los resultados se presentan en las Tablas 5 y 6 a continuación.

25 Tabla 5. Crecimiento celular de células RPMI8226 tratadas con bendamustina, preincubada en medio de cultivo celular durante 0, 1 ó 4 h.

Bendamustina, uM	BM 0 h	BM 1 h	BM 4 h
		Crecimiento celular, %	
1	100	100	100
15	83	100	100
31	70	100	100
62	46	106	104
125	11	20	105
250	-23	-45	75
500	-87	-85	8
1000	-98	-102	-99

30 Tabla 6. Crecimiento celular de células RPMI8226 tratadas con formulación de bendamustina en SBECD/LMWP, preincubada en medio de cultivo celular durante 0, 1 o 4 h.

Bendamustina, uM	BM/SBECD/LMWP 0h	BM/SBECD/LMWP 1h	BM/SBECD/LMWP 4h
		Crecimiento celular, %	
1	100	100	100
15	71	71	114
31	35	37	51
62	21	39	29
125	-14	-25	8
250	-99	-98	-104
500	-99	-98	-101
1000	-96	-98	-108

35 Tabla 7. IC50 de bendamustina y formulación de BM/SBECD/LMWP, preincubadas en medio de cultivo celular durante 0, 1, o 4 h, en células RPMI8226

Tiempo de preincubación, h	IC50 de bendamustina, uM	
	BM	BM/SBECD /LMWP
0	62	32
1	106	38
4	390	53

Para cada tiempo de preincubación, se calcularon los parámetros IC50, TGI, y LC50.

	IC50, $\mu\text{M/h}$	TGI, $\mu\text{M/h}$	LC50, $\mu\text{M/h}$
BM	85 +/- 10	98 +/- 18	107 +/- 11
Formulación de SBECD/LMWP	5,2 +/- 0,2	6,0 +/- 0,1	3,5 +/- 0,9

En la que:

- 5 IC50 – concentración de un fármaco que provoca una inhibición del crecimiento de las células del 50%;
- TGI – concentración de un fármaco que provoca una inhibición total del crecimiento de las células;
- 10 LC50 – concentración de un fármaco que provoca la muerte del 50% de las células.

Los resultados muestran que la composición de de BM, SBECD y LMWP retiene la potencia más tiempo que BM sola.

15 **Ejemplo 24. Citotoxicidad de composición de bendamustina que comprende SBECD y LMWP**

Se mantuvieron células RPMI8226, H69, MDA-MB-231, y H460 en un medio apropiado, que contiene 10% FBS y antibióticos. Después de 24 h tras cultivar en placas, se añadieron bendamustina, y bendamustina formulada en SBECD/LMWP (40 mg/ml de BM en 20% de SBECD, 1% de LMWP) en diferentes concentraciones a los cultivos celulares, y las células se hicieron crecer durante tres días. La citotoxicidad del fármaco se evaluó usando el procedimiento WST-1. Los resultados se presentan en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8

Estirpe celular	BM	SBECD/LMWP
RPMI8226	117	61
H69	254	119
H460	601	228
MDA-MB-231	600	321

25 Los datos anteriores muestran que las composiciones de esta invención poseen una citotoxicidad potenciada.

**Ejemplo 25. Farmacocinética de bendamustina dosificada a ratas en composición con sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica y protamina de bajo peso molecular (LMWP)**

30 Se prepararon las siguientes composiciones para ensayo:

Control: 5 mg/ml de hidrocloreuro de bendamustina, 10,2 mg/ml de manitol en NaCl al 0,9%; dosis de 10 mg/kg

Composición 25A

35 - 5 mg/ml de hidrocloreuro de bendamustina, 20% p/p de sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica, 10,2 mg/g de manitol en agua, dosis de 10 mg/kg.

Composición 25B

40 - 5 mg/ml de hidrocloreuro de bendamustina, 20% p/p de sulfobutil éter  $\beta$ -ciclodextrina sódica, 1% de LMWP, 10,2 mg/g de manitol en agua, dosis de 10 mg/kg.

Animales:

45 Ratas hembra Sprague-Dawley (250-350 g). Los animales se mantuvieron tres por jaula con una cubierta de filtro de aire bajo luz (ciclo de 12 h de luz/oscuridad, la luz se enciende a 06h00) y temperatura controlada 22°C +/- 1°C. Todas las manipulaciones con los animales se realizaron bajo una campana laminar esterilizada. Los animales tuvieron acceso a voluntad a comida Purina para ratones y agua. Los animales se dejaron en ayunas durante toda la noche y se anestesiaron, antes de la dosificación.

Dosificación y toma de muestras:

55 Las composiciones de bendamustina y el control se administraron intravenosamente a ratas en la vena de la cola. Se recogieron muestras de sangre a 5, 15, 30, 45 min., 1, 1,5, 2, 3 y 4 h tras la inyección. Las ratas se anestesiaron mediante inhalación general de isoflurano. Las muestras de sangre se recogieron de la vena yugular con tubo

heparinizado, y se mantuvieron en hielo. La sangre se centrifugó inmediatamente, y se separó el plasma. Las muestras de plasma se extrajeron inmediatamente.

Extracción y análisis de las muestras:

Las muestras de plasma de 0,100 ml se transfirieron a tubos de plástico. Las muestras se extrajeron con 0,400 ml de HCl 100 mM en acetonitrilo mientras se agitaban vigorosamente durante 30 segundos. Las muestras se centrifugaron a 10000 RPM durante 5 minutos. Se separó el sobrenadante. Las muestras se congelaron en hielo seco y se mantuvieron a -80°C hasta el análisis mediante HPLC. Se inyectaron alícuotas de 20 microlitros en el HPLC para el análisis.

Condiciones de HPLC:

Columna de fase inversa C18 50 x 4,6 mm, Symmetry/Shield 3,5 micrómetros

Temperatura de la columna 30°C

Caudal 1,5 ml/min.

Volumen de inyección 20 microlitros

Detección de la fluorescencia a longitudes de onda: excitación 327 nm, emisión 420 nm

Fase móvil: Tampón A: 5% de acetonitrilo 0,1% de TFA

Tampón B: 90% de acetonitrilo 0,1% de TFA

Tiempo del experimento: 10 min.

En la Tabla 9 a continuación se muestran los perfiles farmacocinéticos de bendamustina para la composición ensayada frente al control.

Tabla 9. Concentración de bendamustina en plasma de rata frente a tiempo tras la inyección

Tiempo [horas]	Control [ng/ml]	Composición 25A [ng/ml]	Composición 25B [ng/ml]
	Media (SEM)	Media (SEM)	Media (SEM)
0,08	6045 (388)	5233 (143)	3629 (1286)
0,25	2428 (250)	1702 (217)	1915 (708)
0,5	520 (105)	307 (73)	852 (251)
0,75	145 (35)	72 (25)	468 (80)
1	47 (11)	36 (17)	317(53)
1,5	8 (1)	16 (10)	160 (32)
2	2 (1)	5 (4)	93 (27)
3	0 (0)	0 (0)	47 (20)
4			12(5)

SEM – error estándar de la media

El ejemplo muestra que la presencia de LMWP en la composición Bendamustina con SBEDC incrementó considerablemente el tiempo de semivida de BM en plasma.

#### **Ejemplo 26. Eficacia de composiciones de bendamustina sobre modelo de metástasis pulmonar experimental murino**

Animales

Se adquirieron ratones C57B1/6 de Charles Rivers hembras, de 5 a 6 semanas, de Charles River Canada Inc. Los animales se mantuvieron 5 por jaula con una cubierta de filtro de aire en un entorno de luz (ciclo de luz/oscuridad de 12 h, luz encendida a 6H00) y de temperatura ( $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) controladas. Todas las manipulaciones de los animales se realizaron bajo una campana laminar esterilizada. Los animales tuvieron acceso a *voluntad* a comida Purina para ratones (Pro Lab PMH 4018, marca de Agway, Siracusa, Nueva York) y agua. Estos estudios con animales se realizaron según las "Directrices para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales".

Cultivo de células tumorales:

Se cultivaron células 3LL de carcinoma pulmonar de Lewis en el medio de cultivo apropiado. Las células se cosecharon en su fase de crecimiento logarítmica para la preparación del implante del tumor.

5

Implante del tumor:

Se implantaron células 3LL de carcinoma pulmonar de Lewis (2,0 a 5,0 x 10<sup>5</sup> células en 200 ul de PBS) intravenosamente mediante la vena de la cola para establecer modelos de tumor con metástasis pulmonar experimentales.

10

Tratamientos:

Los tratamientos se realizaron en el día después del implante del tumor. A los animales se les dosificó con las siguientes disoluciones de dosificación:

15

Control: (0,9%, NaCl)

Composiciones:

20

- bendamustina (BM) no formulada, (50 mg/kg)

- bendamustina (50 mg/kg) en 20% de SBECD, 1% de LMWP

25

Evaluación de la eficacia:

La formación de metástasis se evaluó contando los números de manchas metastásicas sobre la superficie pulmonar. El examen rutinario de metástasis se realizó para todos los órganos al final del estudio.

30

En la Tabla 10 a continuación se presentan los resultados de la evaluación de la eficacia.

Tabla 10

Tratamiento	Número de metástasis pulmonar (número de animales)	Inhibición en la formación de metástasis frente al control, (%)	Inhibición en la formación de metástasis frente a BM no formulada (%)
Control	65,5 ± 7,8 (8)	0	-
BM (50 mg/kg)	56,1 ± 9,5 (9)	14,4	0
BM (50 mg/kg), 20% de SBECD, 1% de LMWP	37,0 ± 8,1 (9)	43,5 **	34,0 *
** Estadísticamente significativo, p < 0,01			
* Estadísticamente significativo, p < 0,05			

35 Los resultados muestran una mejora estadísticamente significativa de la eficacia de la composición que comprende SBECD y LMWP frente al fármaco no formulado.

**Ejemplo 27. Eficacia de composiciones de bendamustina sobre tumores sólidos subcutáneos (s.c.) de carcinoma de mama humano (MDA-MB 231) en ratones atímicos.**

40

Animal:

Se adquirieron Ratones *balb/c* de 5 a 6 semanas de Charles River Canada Inc. Los animales se mantuvieron 5 por jaula con una cubierta de filtro de aire en un entorno de luz (ciclo de luz/oscuridad de 12 h, luz encendida a 6H00) y de temperatura (22° ± 1°C) controladas. Todas las manipulaciones de los animales se realizaron bajo una campana laminar esterilizada. Los animales tuvieron acceso a *voluntad* a comida Purina para ratones (Pro Lab PMH 4018, marca de Agway, Siracusa, Nueva York) y agua. Estos estudios con animales se realizaron según las "Directrices para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales".

45

50 Cultivo de células tumorales:

Se cultivaron células de cáncer de mama humano MDA-MB 231 en un medio de cultivo apropiado. Las células se cosecharon en su fase de crecimiento logarítmica para la preparación del implante del tumor.

55

Implante del tumor:

Se implantaron células tumorales o de mioma humanas ( $2,5$  a  $5,0 \times 10^6$  células) subcutáneamente en  $0,200$  ml de medio que contiene  $30\%$  de Matrigel en los dos flancos de ratones *balb/c nu/nu* a través de una aguja de calibre  $20$  de  $1$  a  $2$  cm de longitud.

5 Tratamientos:

Tras  $2$  a  $3$  semanas del implante de las células tumorales, los animales que desarrollaron tumores sólidos s.c. se seleccionaron y dividieron en varios grupos homogéneos ( $n = 5$  animales por grupo o dosis) con respecto al tamaño tumoral ( $0,5$  a  $0,8$  cm de diámetro). Los tratamientos se realizaron al día siguiente. A los animales se les dosificó con las siguientes disoluciones de dosificación.

10

Control: ( $0,9\%$ , NaCl)

15 Composiciones:

- bendamustina (BM) no formulada, ( $35$  mg/kg)

- bendamustina ( $35$  mg/kg) en  $40\%$  de SBECD,  $1\%$  de sulfato de protamina (BM formulada)

20

Evaluación de la eficacia:

Las medidas de los tumores sólidos subcutáneos se llevaron a cabo en el día de la primera inyección y después a intervalos de  $3$  a  $4$  días. Los diámetros perpendiculares más grandes de cada tumor se midieron con calibres, y se estimaron los tamaños tumorales usando la fórmula:

25

$TV = L \times W/2$ , en la que TV: volumen tumoral; L: longitud; W: anchura.

También se anotaron los pesos corporales de los animales.

30

Los resultados se presentan en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11

Grupos (número de animales)	Peso corporal en el día 14 (g)	Volumen de los tumores en el día 14 (g) (número de tumores)	% de inhibición frente al control (en el día 14)	Observaciones
Control ( $0,9\%$ , NaCl) (5)	$19,9 \pm 0,35$ (4)	$1,80 \pm 0,19$ (8)	-	1 de 5 murieron en el día 11 debido a metástasis tumoral. Todos los animales se sacrificaron en el día 14 debido a puntos de límite del protocolo con el tamaño de los tumores.
BM ( $35$ mg/kg) (5)	$18,1 \pm 0,39$ (5)	$0,54 \pm 0,06$ (10)	$70,2\%$	
BM ( $35$ mg/kg), $40\%$ de SBECD, $1\%$ de PS (5)	$18,1 \pm 0,30$ (2)	$0,32 \pm 0,09$ (4)	$82,0\%$	3 de 5 ratones murieron en el día 4 después de los tratamientos.

35

La Tabla 12 muestra el efecto de BM y sus composiciones sobre el crecimiento de tumores.

Tabla 12. Peso de tumores tras el tratamiento en tumores sólidos s.c. de carcinoma de mama humano MDA-MB 231 en ratones atímicos

40

Tiempo [días]	Control no tratado [g]	BM ( $35$ mg/kg) [g]	BM ( $35$ mg/kg), $40\%$ de SBECD, $1\%$ de PS [g]
	Promedio (SEM)	Promedio (SEM)	Promedio (SEM)
0	$0,277$ ( $0,031$ )	$0,237$ ( $0,008$ )	$0,247$ ( $0,012$ )
2	$0,329$ ( $0,034$ )	$0,250$ ( $0,028$ )	$0,242$ ( $0,039$ )
4	$0,436$ ( $0,052$ )	$0,294$ ( $0,027$ )	$0,151$ ( $0,045$ )

Tiempo [días]	Control no tratado [g]	BM (35 mg/kg) [g]	BM (35 mg/kg), 40% de SBECD, 1% de PS [g]
	Promedio (SEM)	Promedio (SEM)	Promedio (SEM)
7	0,615 (0,065)	0,313 (0,030)	0,182 (0,046)
9	0,838 (0,095)	0,349 (0,038)	0,216 (0,046)
11	1,164 (0,149)	0,417 (0,046)	0,232 (0,065)
14	1,803 (0,185)	0,537 (0,055)	0,324 (0,092)

SEM – error estándar de la media

Los resultados muestran una toxicidad inesperada y una buena eficacia de la composición que comprende SBECD y sulfato de protamina.

### 5 Ejemplo 28. Eficacia de composiciones de bendamustina sobre tumores sólidos s.c. de carcinoma de mama humano MDA-MB 231 en ratones atímicos

El experimento se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 27, usando las siguientes composiciones para el tratamiento:

10

Control: (0,9%, NaCl)

Composiciones:

15

- bendamustina (BM) no formulada, (30 mg/kg)

- bendamustina (30 mg/kg) en 40% de SBECD (BM formulada)

20

El tratamiento se llevó a cabo en los días 1, 2, 9, y 10.

Los resultados se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13

Grupos (número de animales)	Calendarios de tratamiento	Peso de los tumores en el día 19 estimado a partir de medidas del tamaño de los tumores (g) (número de tumores)	Peso real de los tumores en el día 19 en la autopsia (g) (número de tumores)
G1. Control (0,9%, NaCl) (5)	Día 1, 2, 9, 10	1,70 ± 0,15 (10)	0,855 ± 0,105 (10)
G2. BM (30 mg/kg) (5)	Día 1, 2, 9, 10	0,684 ± 0,10 (10)	18,1 ± 0,052 (10)
G3. BM (30 mg/kg), 40% de SBECD (5)	Día 1, 2, 9, 10	1,05 ± 0,18 (10)	0,413 ± 0,067 (10)

25

La Tabla 14 muestra el efecto de BM y sus composiciones sobre el crecimiento de tumores.

Tabla 14. Peso de los tumores tras el tratamiento en tumores sólidos s.c. de carcinoma de mama humano MDA-MB 231 en ratones atímicos

30

Tiempo [días]	Control no tratado [g]	BM (30 mg/kg) [g]	BM (30 mg/kg), 40% de SBECD, [g]
	Promedio (SEM)	Promedio (SEM)	Promedio (SEM)
0	0,252 (0,020)	0,203 (0,028)	0,200 (0,024)
2	0,288 (0,019)	0,238 (0,023)	0,245 (0,022)
5	0,384 (0,029)	0,267 (0,022)	0,300 (0,027)
7	0,536 (0,028)	0,313 (0,028)	0,392 (0,038)
9	0,693 (0,044)	0,388 (0,045)	0,522 (0,060)
12	1,034 (0,049)	0,497 (0,060)	0,641 (0,071)
14	1,174 (0,065)	0,550 (0,075)	0,756 (0,090)
16	1,456 (0,104)	0,594 (0,084)	0,853 (0,125)
19	1,704 (0,145)	0,684 (0,098)	1,051 (0,176)

SEM – error estándar de la media

Los datos anteriores muestran que un sistema de dos componentes que comprende bendamustina y una ciclodextrina cargada (sin un agente estabilizante opuestamente cargado) es menos que el de bendamustina solo.



**Ejemplo 29. Eficacia de composiciones de bendamustina sobre tumores en tumores sólidos s.c. de carcinoma de mama humano MDA-MB 231 en ratones atímicos**

El experimento se llevó a cabo utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo 28, usando las siguientes composiciones para tratamiento:

Control: (0,9%, NaCl)

Composiciones:

- bendamustina (BM) no formulada, (30 mg/kg)

- bendamustina (30 mg/kg) en 20% de SBECD, 1% de LMWP (BM formulada)

El tratamiento se llevó a cabo en los días 1, 2, 9, y 10.

Los resultados se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15

Grupos (número de animales)	Calendarios de tratamiento	Peso de los tumores en el día 16 (g) (número de tumores)	% de inhibición frente al control (en el día 16)
G1. Control (0,9%, NaCl) (6)	Día 1, 2, 9, 10	18,1 ± 0,056 (6)	-
G2. BM (30 mg/kg) (6)	Día 1, 2, 9, 10	18,1 ± 0,067 (6)	38,3
G3. BM (30 mg/kg), 20% de SBECD, 1% de LMWP (6)	Día 1, 2, 9, 10	0,364 ± 0,028 (6)	53,9

Nota. Los tumores implantados en el flanco izquierdo fueron mucho más pequeños que los del flanco derecho, debido al menor número de células tumorales inoculado. El volumen de estos tumores no se incluye en los datos presentados.

Los resultados muestran que la composición de bendamustina con 20% de SBECD y 1% de LMWP es más activa que el fármaco no formulado – un resultado que es inesperado a partir de los resultados obtenidos en el Ejemplo 28 anterior.

Tabla 16. Peso de los tumores tras el tratamiento en tumores sólidos s.c. de carcinoma de mama humano MDA-MB 231 en ratones atímicos

Tiempo [días]	Control no tratado [g]	BM (30 mg/kg) [g]	BM (30 mg/kg), 20% de SBECD, 1% de LMWP [g]
	Promedio (SEM)	Promedio (SEM)	Promedio (SEM)
0	0,161 (0,007)	0,139 (0,013)	0,140 (0,018)
2	0,187 (0,011)	0,178 (0,027)	0,163 (0,016)
4	0,233 (0,024)	0,202 (0,039)	0,167 (0,016)
6	0,288 (0,036)	0,259 (0,049)	0,188 (0,010)
8	0,344 (0,027)	0,295 (0,054)	0,216 (0,014)
10	0,422 (0,031)	0,319 (0,044)	0,234 (0,013)
12	0,508 (0,041)	0,361 (0,050)	0,258 (0,012)
14	0,589 (0,057)	0,417 (0,054)	0,319 (0,022)
16	0,789 (0,056)	0,487 (0,067)	0,364 (0,028)

SEM – error estándar de la media

**Ejemplo 30. Estabilidad química de bendamustina en composiciones con sulfobutil beta ciclodextrina (SBECD) y protamina de bajo peso molecular (LMWP) en tampón de fosfato.**

Se preparó SBECD al 4% (p/p) en tampón de fosfato (SBECD/PB) disolviendo SBECD en tampón de fosfato 5 mM y ajustando el pH hasta 7,2.

Se prepararon las siguientes composiciones y se sometieron a ensayo:

Control: 0,6 mg/ml de hidrocloreuro de bendamustina (BM) en agua, preparado disolviendo BM en tampón de fosfato 5 mM (PB) pH 7,2

Composición 30-1: 0,6 mg/ml de BM en SBECD al 4% preparada disolviendo BM en SBECD/PB

Composición 30-2: 0,6 mg/ml BM en SBECD al 4% y LMWP al 0,2%, preparada disolviendo BM en SBECD/PB, y añadiendo LMWP

5 Composición 30-3: 0,6 mg/ml BM en SBECD al 4% y LMWP al 1%, preparada disolviendo BM en SBECD/PB, y añadiendo LMWP

Composición 30-4: 0,6 mg/ml BM en SBECD al 4% y LMWP al 0,2%, preparada disolviendo LMWP en SBECD/PB, y añadiendo BM

10 Composición 30-5: 0,6 mg/ml BM en SBECD al 4% y LMWP al 0,2%, preparada disolviendo LMWP en SBECD/PB, y añadiendo BM.

15 Las composiciones se incubaron a 25°C, y se analizaron periódicamente mediante HPLC según lo siguiente. Se separaron muestras de 10 µl en HPLC usando una columna Waters SymmetryShield RP-18 3,5 µm (4,6 x 50 mm) al caudal de 1,5 ml/min. de gradiente de acetonitrilo-agua que contiene 0,1% de TFA. La detección de los picos se llevó a cabo por medio de detección de la absorción de UV a 260 nm. El área del pico de bendamustina se usó para evaluar la velocidad de descomposición del fármaco en el modelo cinético de primer orden. Los resultados expresados como semividas de descomposición (T1/2) se presentan en la Tabla 17 a continuación.

20

Tabla 17

Composición	T1/2
Control: 0,6 mg/ml de BM	44 min
Composición 30-1: 4% de SBECD, 0,6 mg/ml de BM	642 min
Composición 30-2: 4% de SBECD, 0,6 mg/ml de BM, 0,2% de LMWP	707 min
Composición 30-3: 4% de SBECD, 0,6 mg/ml de BM, 1% de LMWP	789 min
Composición 30-4: 4% de SBECD, 0,2% de LMWP, 0,6 mg/ml de BM	673 min
Composición 30-5: 4% de SBECD, 1% de LMWP, 0,6 mg/ml de BM	729 min

Los resultados muestran que LMWP incrementa la estabilidad de BM en una disolución de BM y SBECD. Los resultados muestran también que el efecto estabilizante de LMWP es mayor si este compuesto se añade a la mezcla previamente preparada de BM y SBECD (composición 30-3 frente a 30-5, y composición 30-2 frente a 30-4, respectivamente).

25

**Ejemplo 31. Estabilidad química de bendamustina en plasma.**

A plasma humano heparinizado se le añadieron, 20 µl en 780 µl de plasma, las siguientes composiciones de bendamustina (BM):

30

Control: 0,6 mg/ml de hidrocloreuro de bendamustina (BM) en agua, preparado disolviendo BM en agua.

35

Composición 31-A: 0,6 mg/ml de BM en SBECD al 4%, preparada disolviendo BM en disolución al 4% (p/p) de SBECD en agua

Composición 31-B: 0,6 mg/ml de BM en SBECD al 8%, preparada disolviendo BM en disolución al 8% (p/p) de SBECD en agua

40

Composición 31-C: 0,6 mg/ml de BM en SBECD al 20%, preparada disolviendo BM en disolución al 20% (p/p) de SBECD en agua

Composición 31-D: 0,6 mg/ml de BM en SBECD al 40%, preparada disolviendo BM en disolución al 40% (p/p) de SBECD en agua

45

Composición 31-1: 0,6 mg/ml de BM en SBECD al 4% y PI2080 al 3%, preparada disolviendo BM en disolución al 4% (p/p) de SBECD en agua, y añadiendo PI2080

50

Composición 31-2: 0,6 mg/ml de BM en SBECD al 8% y PI2080 al 3%, preparada disolviendo BM en disolución al 8% (p/p) de SBECD en agua, y añadiendo PI2080

Composición 31-3: 0,6 mg/ml de BM en SBECD al 20% y PI2080 al 3%, preparada disolviendo BM en disolución al 20% (p/p) de SBECD en agua, y añadiendo PI2080

55

Composición 31-4: 0,6 mg/ml de BM en SBECD al 40% y PI2080 al 3%, preparada disolviendo BM en disolución al 40% (p/p) de SBECD en agua, y añadiendo PI2080

La concentración de bendamustina en plasma tras la adición fue inicialmente 0,015 mg/ml. Las muestras de plasma a las que se añadieron las composiciones se incubaron a 37°C. Se retiró periódicamente una muestra de 50 µl del plasma al que se le añadió composición, y se transfirió a 200 µl de disolución 100 mM de HCl en acetonitrilo, se mezcló y se centrifugó. 50 µl del sobrenadante se diluyeron 20 veces con acetonitrilo al 95%, y después 20 µl de las muestras diluidas se separaron en una columna Waters SymmetryShield RP18 3,5 µm (4,6 x 50 mm) usando gradiente de acetonitrilo (0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA), caudal 1,5 ml/min. La detección de los picos se llevó a cabo por medio de detección de fluorescencia con extinción a 327 nm y emisión a 420 nm. El área del pico de bendamustina se usó para evaluar la velocidad de descomposición del fármaco en el modelo cinético de primer orden. Los resultados expresados como semividas de descomposición (T1/2) se presentan en la Tabla 18 a continuación.

Tabla 18

Formulación	T1/2 en plasma
Control: 0,6 mg/ml de BM	123 min
Composición 31-A: 0,6 mg/ml de BM, 4% de SBECD	134 min
Composición 31-B: 0,6 mg/ml de BM, 8% de SBECD	137 min
Composición 31-C: 0,6 mg/ml de BM, 20% de SBECD	174 min
Composición 31-D: 0,6 mg/ml de BM, 40% de SBECD	242 min
Composición 31-1: 0,6 mg/ml de BM, 4% de SBECD, 3% de PI2080	182 min
Composición 31-2: 0,6 mg/ml de BM, 8% de SBECD, 3% de PI2080	251 min
Composición 31-3: 0,6 mg/ml de BM, 20% de SBECD, 3% de PI2080	297 min
Composición 31-4: 0,6 mg/ml de BM, 40% de SBECD, 3% de PI2080	302 min

Los resultados muestran que PI2080 incrementa la estabilidad de BM en plasma.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Composición que comprende:

5 (a) bendamustina; y (b) sulfobutil éter beta-ciclodextrina.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que la proporción de bendamustina respecto a sulfobutil éter beta-ciclodextrina es de entre 1:12.500 y 1:25, en peso.