



(12) PATENT

(11) 343659

(13) B1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

*A61K 31/4184 (2006.01)*

*A61K 9/10 (2006.01)*

*A61K 9/19 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

### Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	20073722	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.01.13 PCT/US2006/01308
(22)	Inng.dag	2007.07.18	(85)	Videreføringsdag	2007.07.18
(24)	Løpedag	2006.01.13	(30)	Prioritet	2005.01.14, US, 60/644,354 2006.01.12, US, 11/330,868
(41)	Alm.tilgj	2007.09.27			
(45)	Meddelt	2019.04.29			
(73)	Innehaver	Cephalon, Inc., 1090 Horsham Road, PA19454 NORTH WALES, USA			
(72)	Oppfinner	Jason Edward Brittain, 1580 Chiswick Court, CA92020 EL CAJON, USA Joe Craig Franklin, 3708 45th Street, OK74135 TULSA, USA			
(74)	Fullmektig	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge			

---

(54)	Benevnelse	<b>Farmasøytiske sammensetning omfattende bendamustin og fremgangsmåte for fremstilling av en lyofilisert farmasøytisk sammensetning.</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	DD 159289 A1, MAAS B: "Stabilität von Bendamustinhydrochlorid in Infusionslösungen" PHARMAZIE, DIE, GOVI VERLAG, ESCHBORN, DE, vol. 49, no. 10, 1994, pages 775-777, WERNER W ET AL: "Hydrolyseprodukte des Cancerostaticums Cytostasan (Bendamustin)" PHARMAZIE, DIE, GOVI VERLAG, ESCHBORN, DE, vol. 42, no. 4, 1987, pages 272-273, SCASNAR V ET AL: "Radiochemical assay of stability of <sup>14</sup> C-cytostasan solutions during preparation and storage" JOURNAL OF RADIOANALYTICAL AND NUCLEAR CHEMISTRY 1988 SWITZERLAND, vol. 121, no. 2, 1988, pages 489-497			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer farmasøytiske formuleringer av lyofilisert bendamustin egnet for farmasøytisk anvendelse. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre fremgangsmåter for fremstilling av lyofilisert bendamustin. De farmasøytiske formuleringene kan bli anvendt for en hvilken som helst sykdom som er sensitiv for behandling med bendamustin, så som neoplastiske sykdommer.

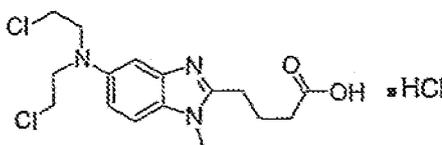
Foreliggende oppfinnelse vedrører området farmasøytiske sammensetninger. Sammensetningene kan anvendes for behandling av forskjellige sykdomstilstander, spesielt neoplastiske sykdommer og autoimmune sykdommer. Oppfinnelsen vedrører spesielt farmasøytiske sammensetninger omfattende nitrogensennepen bendamustin eller bendamustin-HCl.

Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for fremstilling av en lyofilisert farmasøytisk sammensetning.

Følgende beskrivelse inkluderer informasjon som kan være nyttig for forståelsen av foreliggende oppfinnelse. Det er ikke en innrømmelse av at en hvilken som helst slik informasjon gjelder kjent teknikk eller er relevant med hensyn til den foreliggende oppfinnelse, eller at hvilken som helst publikasjon som spesifikt eller implisitt blir referert til heri er kjent teknikk.

På grunn av deres høye reaktivitet i vandige løsninger er nitrogensenneper vanskelige å formulere som farmasøytiske preparater og blir ofte gitt for administrering i en lyofilisert form som krever rekondisjonering, vanligvis i vann, av fagkyndig sykehuspersonale før administrering. Når i vandig løsning blir nitrogensenneper utsatt for nedbrytning ved hydrolyse slik at det rekondisjonerte produktet bør administreres til en pasient så fort som mulig etter rekondisjonering derav.

Bendamustin, (4-{5-[bis(2-kloretyl)amino]-1-metyl-2-benzimidazolyl]-smørsyre, er en atypisk struktur med en benzimidazolring, hvor strukturen inkluderer en aktiv nitrogensennep (se formel I, som viser bendamustinhydroklorid).



Formel I

Bendamustin ble innledningsvis syntetisert i 1963 i den tyske demokratiske republikk (GDR) og var tilgjengelig fra 1971 til 1992 i det området under navnet Cytostasan<sup>®</sup>. Siden denne tiden er det blitt markedsført i Tyskland under varemerket Ribimustin<sup>®</sup>. Det er blitt meget anvendt i Tyskland for å behandle kronisk lymfocytisk leukemi, Hodgkins sykdom, non-Hodgkins lymfom, multipel myelom og brystcancer.

Grunnet dets nedbrytning i vandige løsninger (som andre nitrogensenneper), blir bendamustin tilført som et lyofilisert produkt. Den for tiden lyofiliserte formuleringen av bendamustin (Ribomustin<sup>®</sup>) inneholder bendamustinhydroklorid og mannitol i en steril lyofilisert form som et hvitt pulver for intravenøs anvendelse etter rekondisjonering. Det endelige lyofilisatet er ustabil når eksponert for lys. Derfor blir produktet lagret i brune eller brunfargede glassflasker. Den gjeldende lyofiliserte formuleringen av bendamustin inneholder nedbrytningsproduktet som kan oppstå i løpet av fremstillingen av medikamentsubstansen og/eller i løpet av lyofiliseringsprosessen for å danne det endelige medikamentproduktet.

For tiden blir bendamustin formulert som et lyofilisert pulver for injeksjon med 100 mg medikament pr. 50 ml beholder eller 25 mg medikament pr. 20 ml beholder. Beholderne blir åpnet og rekondisjonert så nær opptil tiden for administrering til pasienten som mulig. Produktet blir rekondisjonert med 40 ml (for 100 mg presentasjon) eller 10 ml (for 25 mg presentasjon) av sterilt vann for injeksjon. Det rekondisjonerte produktet blir ytterligere fortynt i 500 ml, q.s., 0,9 % natriumklorid for injeksjon. Administreringsveien er ved intravenøs infusjon i 30-60 min.

Etter rekondisjonering med 40 ml sterilt vann for injeksjon er beholderne av bendamustin stabile i en periode på 7 timer under romtemperaturlagring eller i 6 dager ved lagring ved 2-8°C. 500 ml sammenblandet løsning må bli administrert til pasienten i løpet av 7 timer etter beholder-rekondisjonering (når det antas lagring ved romtemperatur av sammenblandingen).

Rekondisjonering av foreliggende lyofiliserte bendamustinpulver er vanskelig. Rapporter fra klinikken indikerer at rekondisjoneringen kan kreve minst 15 min. og kan kreve så lenge som 30 min. Bortsett fra at det er arbeidskrevende og tidkrevende for helsepersonell som er ansvarlig for rekondisjonering av produktet så øker den lange eksponeringen av bendamustin for vann i løpet av rekondisjoneringsprosessen potensialet for tap av potens og dannelse av urenheter grunnet hydrolyse av produktet med vann.

Det er derfor et behov for lyofiliserte formuleringer av bendamustin som er lettere å rekondisjonere og som har en bedre profil når det gjelder urenheter enn gjeldende lyofilisat (lyofilisert pulver) formuleringer av bendamustin.

Tysk (GDR) patent nr. 34727 beskriver en fremgangsmåte for fremstilling av  $\omega$ -{5-bis-( $\beta$ -kloretyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]-alkankarboksylysyrer substituert i 1-posisjonen.

5 Tysk (GDR) patent nr. 80967 beskriver et injiserbart preparat av  $\gamma$ -[1-metyl-5-bis-( $\beta$ -kloretyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]-smørsyrehydroklorid.

Tysk (GDR) patent nr. 159877 beskriver en fremgangsmåte for fremstilling av 4-[1-metyl-5-bis-(2-kloretyl)amino-benzimidazolyl-2)-smørsyre.

Tysk (GDR) patent nr. 159289 beskriver en injiserbar løsning av bendamustin.

10 Ribomustin<sup>®</sup> bendamustine Product monograph (oppdatert 1/2002)  
[http://www.ribosepharm.de/pdf/ribomustin\\_bendamustin/productmonograph.pdf](http://www.ribosepharm.de/pdf/ribomustin_bendamustin/productmonograph.pdf)  
tilveiebringer informasjon angående Ribomustin<sup>®</sup> inkludert produktbeskrivelse.

Ni et al. rapporterer at nitrosurea SarCNU var mer stabil i ren tertiær butanol enn i ren eddiksyre, dimetylsulfoksid, metylhydroksey, vann eller i  
15 TBA/vannblandinger (Ni et al. (2001) *Intl. J. Pharmaceutics* 226:39-46).

Lyofilisert syklofosfamid er kjent innenfor fagområdet se f.eks. US patent nr. 5 418 223, 5 413 995, 5 268 368, 5 227 374, 5 130 305, 4 659 699, 4 537 883 og 5 066 647.

20 Lyofilisert nitrogensennep i fosfamid er beskrevet i internasjonal publikasjon nr. WO 2003/066027, US patenter nr. 6 613 927, 5 750 131, 5 972 912, 5 227 373 og 5 204 335.

Teagarden et al. beskriver lyofiliserte formuleringer av prostaglandin E-1 dannet ved oppløsning av PGE-1 i en løsning av laktose og tertiær butylalkohol (US patent nr. 5 770 230).

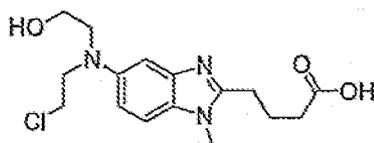
25 Den foreliggende oppfinnelse vedrører en farmasøytisk sammensetning som omfatter bendamustin eller bendamustin-hydroklorid, mannitol, tertiær butylalkohol og vann, hvor nevnte bendamustin eller bendamustinhydroklorid er tilstede i en konsentrasjon på 12-17 mg/ml, nevnte mannitol er tilstede i en  
30 konsentrasjon på 20-30 mg/ml, og nevnte tertiære butylalkohol er tilstede i en konsentrasjon på 20-30% (volum/volum).

Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for fremstilling av en lyofilisert farmasøytisk sammensetning ved lyofilisering av den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen hvor lyofiliseringen omfatter

- i) frysing av den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 1 til en temperatur under - 40 °C for å danne en frosset oppløsning;
- ii) holding av den frosne oppløsningen ved en temperatur som er ved eller under - 40 °C i minst 2 timer;
- iii) økning av temperaturen i den frosne oppløsningen til en primær tørketemperatur på mellom - 40 °C og - 10 °C for å danne en tørket oppløsning;
- iv) holding av oppløsningen ved den primære tørketemperaturen i 10 til 70 timer;
- v) økning av temperaturen i den tørkede oppløsningen til en sekundær tørketemperatur på mellom 25 °C og 40 °C; og
- vi) holding av oppløsningen ved den sekundære tørketemperaturen i 5 til 40 timer for å danne den lyofiliserte farmasøytiske sammensetningen.

Særlige foretrukne utførelsesformer av de foreliggende oppfinnelser er angitt i henholdsvis kravene 2 og 4 til 9.

En farmasøytisk sammensetning av bendamustin er beskrevet som inneholder ikke mer enn omtrent 0,5 % til omtrent 0,9 % (areal ("area") % av bendamustin) HP1, som vist i formel II,

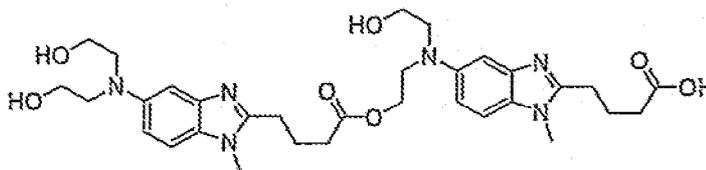


Formel II

ved tidspunktet for frigjøring eller når HP1 er mengden av HP1 tilstede ved tid null etter rekondisjonering av en lyofilisert farmasøytisk sammensetning av bendamustin som beskrevet heri. I en foretrukket farmasøytisk sammensetning av bendamustin er inneholdet ikke mer enn omtrent 0,5 % (areal% av bendamustin) HP1, fortrinnsvis ikke mer enn omtrent 0,45 %, mer foretrukket ikke mer enn omtrent 0,40 %, mer foretrukket ikke mer enn omtrent 0,35 %, enda mer foretrukket ikke mer enn 0,30 %.

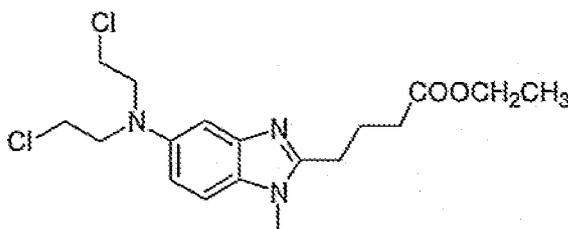
Et lyofilisert preparat av bendamustin er beskrevet som inneholder ikke mer enn omtrent 0,1 % til omtrent 0,3 % bendamustindimer som vist i formel III ved frigjøring eller ved tid null etter rekondisjonering

5



Formel III.

I en utførelsesform ifølge oppfinnelsen inneholder det lyofiliserte preparat av bendamustin ikke mer enn 0,5 % bendamustinetylester som vist i formel IV ved frigjøring eller ved tid null etter rekondisjonering



Formel IV.

Det lyofiliserte preparat av bendamustin inneholder fortrinnsvis 0,15 % til 0,5 % av bendamustinetylester med formel IV ved frigjøring eller ved tid null etter rekondisjonering.

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er et lyofilisert preparat av bendamustin hvor konsentrasjonen av bendamustinetylester (formel IV) ikke er mer enn 0,2 %, fortrinnsvis 0,1 % høyere enn konsentrasjonen av bendamustinetylester som er tilstede i medikamentsubstansen anvendt for å danne den lyofiliserte preparatet.

Et lyofilisert preparat av bendamustin er beskrevet som ikke inneholder mer enn omtrent 0,5 % til omtrent 0,9 % (areal% av bendamustin) HP1 ved tidspunkt for frigjøring av medikamentprodukt. Foretrukket inneholder et lyofilisert preparat av bendamustin ikke mer enn omtrent 0,50 % (areal% av bendamustin) HP1, fortrinnsvis ikke mer enn omtrent 0,45 %, mer foretrukket ikke mer enn omtrent 0,40 %, mer foretrukket ikke mer enn omtrent 0,75 %, enda mer foretrukket ikke mer enn 0,30 %. Et aspekt av dette er lyofiliserte preparater av bendamustin inneholdende ikke mer enn omtrent 0,5 % til omtrent 0,9 %, fortrinnsvis 0,5 %, (areal% av bendamustin) HP1 ved tidspunkt for frigjøring av medikamentproduktet hvor det lyofiliserte preparatet blir pakket i en beholder eller annen farmasøytisk akseptabel beholder.

I et annet aspekt er det lyofiliserte preparatet av bendamustin stabilt med hensyn på mengden av HP1 i minst omtrent 6 måneder, fortrinnsvis 12 måneder, fortrinnsvis 24 måneder, til omtrent 36 måneder eller lengre når lagret ved omtrent 2°C til omtrent 30°C. Foretrukne temperaturer for lagring er omtrent 5°C og omtrent romtemperatur.

En farmasøytisk doseringsform er beskrevet som inkluderer en farmasøytisk sammensetning av bendamustin inneholdende ikke mer enn omtrent 0,5 % til omtrent 0,9 % HP1, fortrinnsvis ikke mer enn 0,50 %, fortrinnsvis ikke mer enn omtrent 0,45 %, mer foretrukket ikke mer enn omtrent 0,40 %, mer foretrukket ikke mer enn omtrent 0,35 %, enda mer foretrukket ikke mer enn 0,30 %, hvor HP1 er mengden av HP1 tilstede ved frigjøring eller ved tid null etter rekondisjonering av et lyofilisert preparat av bendamustin. I foretrukne aspekter kan doseringsformen være omtrent 5 til omtrent 500 mg av bendamustin, omtrent 10 til omtrent 300 mg av bendamustin, omtrent 25 mg av bendamustin, omtrent 100 mg av bendamustin og omtrent 200 mg av bendamustin.

En farmasøytisk doseringsform er beskrevet som inkluderer et lyofilisert preparat av bendamustin inneholdende ikke mer enn omtrent 0,5 % til omtrent 0,9 %, fortrinnsvis 0,5 % HP1. Foretrukne doseringsformer kan være omtrent 5 til omtrent 500 mg av bendamustin, omtrent 10 til omtrent 300 mg av bendamustin, omtrent 25 mg av bendamustin, omtrent 100 mg av bendamustin, og omtrent 200 mg av bendamustin.

En farmasøytisk sammensetning av bendamustin er beskrevet som inkluderer bendamustin inneholdende ikke mer enn omtrent 0,5 % til omtrent 0,9 % (areal% av bendamustin), fortrinnsvis ikke mer enn omtrent 0,50 %, fortrinnsvis ikke mer enn omtrent 0,45 %, mer foretrukket ikke mer enn omtrent 0,40 %, mer foretrukket ikke mer enn omtrent 0,35 %, enda mer foretrukket ikke mer enn 0,30 %, og en spormengde av ett eller flere organiske løsningsmidler, hvor nevnte HP1 er mengden av HP1 tilstede ved frigjøring eller tid null etter rekondisjonering av en lyofilisert farmasøytisk sammensetning av bendamustin som beskrevet heri. I forskjellige aspekter blir det organiske løsningsmidlet valgt fra én eller flere av tertiær butanol, n-propanol, n-butanol, isopropanol, etanol, metanol, aceton, etylacetat, dimetylkarbonat, acetonitril, diklormetan, metyletylketon, metylisobutylketon, 1-pentanol, metylacetat, karbontetraklorid, dimetylsulfoksid,

heksafluoracetone, klorbutanol, dimetylsulfon, eddiksyre og sykloheksan.

Foretrukne organiske løsningsmidler inkluderer én eller flere av etanol, metanol, propanol, butanol, isopropanol og tertiær butanol. Et mer foretrukket organisk løsningsmiddel er tertiær butanol, også kjent som TBA, t-butanol, tert-butylalkohol eller tertiær butylalkohol.

En fremgangsmåte for oppnåelse av myndighetsgodkjenning ("agency approval") er beskrevet for et bendamustinprodukt, idet forbedringen inkluderer innstilling av en frigjøringsspesifikasjon for bendamustinnedbrytningsmidler på mindre enn omtrent 4,0 %, fortrinnsvis omtrent 2,0 % til omtrent 4,0 % (areal% bendamustin) eller på annen måte oppnå de farmasøytiske sammensetninger beskrevet heri. Et aspekt av denne utførelsesformen er en fremgangsmåte for oppnåelse av myndighetsgodkjenning for et bendamustinprodukt som inkluderer setting av en frigjøringsspesifikasjon for HP1 til mindre enn eller lik 1,5 % (areal% bendamustin). Bendamustinproduktet heri inneholder ikke mer enn omtrent 0,5 % (areal% bendamustin) HP1 ved frigjøring.

En annen fremgangsmåte for oppnåelse av myndighetsgodkjenning for et bendamustinprodukt inkluderer forbedringen slik som fastsetting av en hylletidsspesifikasjon for bendamustinnedbrytningsmidler til mindre enn omtrent 7,0 %, fortrinnsvis omtrent 5 % til omtrent 7,0 %, (areal% bendamustin) hvor produktet blir lagret ved omtrent 2°C til omtrent 30°C. Foretrukne temperaturer for lagring er omtrent 5°C og omtrent romtemperatur. Bendamustinproduktet heri inneholder ikke mer enn omtrent 0,5 % (areal% bendamustin) HP1 ved frigjøring.

En fremgangsmåte for fremstilling av et lyofilisert preparat av bendamustin er beskrevet som inkluderer kontrollering av konsentrasjon av bendamustinnedbrytningsmidler i sluttproduktet, slik at konsentrasjonen av bendamustinnedbrytningsmidler er mindre enn omtrent 4,0 %, fortrinnsvis ikke mer enn omtrent 2,0 % til omtrent 4,0 % (areal% av bendamustin) ved frigjøring eller ellers for å oppnå de farmasøytiske sammensetningene. Bendamustinproduktet inneholder ikke mer enn omtrent 0,5 % til omtrent 0,9 %, fortrinnsvis omtrent 0,5 % (areal% av bendamustin) HP1 ved frigjøring.

En fremgangsmåte for fremstilling av et lyofilisert preparat av bendamustin er beskrevet som omfatter kontrollering av konsentrasjon av bendamustinnedbrytningsmidler i sluttproduktet slik at, ved frigjøring, er konsentrasjonen av

HP1 mindre enn 0,9 %, fortrinnsvis 0,5 % (areal% av bendamustin) og, ved tidspunkt for produktutløp, er konsentrasjonen av bendamustinnedbrytningsmidler mindre enn omtrent 7,0 %, fortrinnsvis ikke mer enn omtrent 5,0 % til omtrent 7,0 %; hvor nevnte produkt blir lagret ved omtrent 2°C til omtrent 30°C.

5 En bendamustin prelyofiliseringsløsning eller dispersjon omfattende ett eller flere organiske løsningsmidler er beskrevet hvor løsningen eller dispersjonene inkluderer minst én stabiliserende konsentrasjon av et organisk løsningsmiddel som reduserer nivået av nedbrytning av bendamustin slik at mengden av HP1 produsert i løpet av lyofiliseringen fra omtrent 0-24 timer ikke overskrider omtrent 10 0,5 % til omtrent 0,9 % (areal% av bendamustin), fortrinnsvis 0,50 %, fortrinnsvis 0,45 %, mer foretrukket 0,40 %, mer foretrukket 0,35 %, enda mer foretrukket 0,30 %. Et aspekt av denne utførelsesformen er det lyofiliserte pulveret produsert fra prelyofiliseringsløsningen eller dispersjonen.

15 En bendamustin prelyofiliseringsløsning eller dispersjon er beskrevet omfattende ett eller flere organiske løsningsmidler hvor løsningen eller dispersjonene inkluderer minst en stabiliserende konsentrasjon av et organisk løsningsmiddel som reduserer nivået av nedbrytning av bendamustin slik at mengden av bendamustinetylester produsert i løpet av lyofiliseringen fra omtrent 0-24 timer ikke overskrider omtrent 0,5 % (areal% bendamustin). I et aspekt er det 20 lyofiliserte pulveret produsert fra prelyofiliseringsløsningen eller dispersjonen.

En bendamustin prelyofiliseringsløsning eller dispersjon omfattende ett eller flere organiske løsningsmidler er beskrevet hvor løsningen eller dispersjonen inkluderer minst én stabiliserende konsentrasjon av et organisk løsningsmiddel som reduserer nivået av nedbrytning av bendamustin slik at mengden av 25 bendamustinetylester (som vist i formel IV) produsert i løpet av lyofiliseringen fra omtrent 0-24 timer ikke er mer enn 0,2 %, fortrinnsvis 0,1 % høyere enn konsentrasjonen av bendamustinetylester som tilstede i medikamentsubstansen anvendt for å danne prelyofiliseringsløsningen. Et foretrukket organisk løsningsmiddel er tertiær butanol.

30 Fremgangsmåter for fremstilling av et bendamustin-lyofilisert preparat er beskrevet som inkluderer oppløsning av bendamustin i en stabiliseringskonsentrasjon av et alkoholløsningsmiddel på mellom omtrent 5 % til omtrent 100 % (volum/volum alkohol for å danne en prelyofiliseringsløsning); og lyofilisering av

prelyofiliseringsløsningen; hvor bendamustinlyofiliserings-preparatet dannet fra slike metoder ikke inneholder mer enn omtrent 0,5 % til omtrent 0,9 %, fortrinnsvis 0,5 % (areal% av bendamustin) HP1 som vist i formel II; hvor nevnte HP1 er mengden av HP1 tilstede ved frigjøring eller ved tid null eller gjenoppretting av den lyofiliserte farmasøytiske sammensetningen av bendamustin. Andre alkoholkonsentrasjoner inkluderer omtrent 5 % til omtrent 99,9 %, omtrent 5 % til omtrent 70 %, omtrent 5 % til omtrent 60 %, omtrent 5 % til omtrent 50 %, omtrent 5 % til omtrent 40 %, omtrent 20 % til omtrent 25 %. Foretrukne konsentrasjoner av alkohol er fra omtrent 20 % til omtrent 30 %. Foretrukne alkoholer inkluderer én eller flere av metanol, etanol, propanol, iso-propanol, butanol og tertiær-butanol. En mer foretrukket alkohol er tertiær butanol. En foretrukket konsentrasjon av tertiær butanol er omtrent 20 % til omtrent 30 %, fortrinnsvis omtrent 30 %. I et aspekt tilsettes en eksipient før lyofilisering. En foretrukket eksipient er mannitol. Foretrukne pre-lyofiliserte konsentrasjoner av bendamustin er fra omtrent 2 mg/ml til omtrent 50 mg/ml.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et bendamustin-lyofilisert preparat omfatter lyofilisering av prelyofiliseringsløsningen ved i) frysing av prelyofiliseringsløsningen til en temperatur under  $-40^{\circ}\text{C}$ , fortrinnsvis  $-50^{\circ}\text{C}$ , for å danne en frosne løsning; ii) holding av den frosne løsningen ved eller under  $-40^{\circ}\text{C}$ , fortrinnsvis  $-50^{\circ}\text{C}$ , i minst 2 timer; iii) økning av temperaturen i den frosne løsningen til en primær tørketemperatur mellom  $-40^{\circ}\text{C}$  og  $-10^{\circ}\text{C}$  for å danne en tørket løsning; iv) holding i omtrent 10 til omtrent 70 timer, v) føring av den tørkede løsningen til en sekundær tørketemperatur mellom  $25^{\circ}\text{C}$  og  $40^{\circ}\text{C}$ ; og vi) holding i omtrent 5 til omtrent 40 timer for å danne et bendamustinlyofilisert preparat. I en mer foretrukket metode omfatter lyofilisering av prelyofiliseringsløsningen i) frysing av prelyofiliseringsløsningen til omtrent  $-50^{\circ}\text{C}$  for å danne en frosne løsning; ii) holding av den frosne løsningen ved omtrent  $-50^{\circ}\text{C}$  i minst 2 timer til 4 timer; iii) økning til en primær tørketemperatur mellom  $-20^{\circ}\text{C}$  og  $-12^{\circ}\text{C}$  for å danne en tørket løsning; iv) holding ved en primær tørketemperatur i omtrent 10 til omtrent 48 timer; v) føring av den tørkede løsningen til en sekundær tørketemperatur mellom  $25^{\circ}\text{C}$  og  $40^{\circ}\text{C}$ ; og vi) holding ved en sekundær tørketemperatur i minst 5 timer opp til omtrent 20 timer. Som alkohol anvendes tertiær-butanol. Konsentrasjonen av tertiær-butanol er 20 % til

30 %, fortrinnsvis omtrent 30 %. En eksipient tilsettes for lyofilisering. Eksipienten er mannitol. En foretrukket prelyofilisert konsentrasjon av bendamustin er 15 mg/ml.

Foreliggende oppfinnelse innbefatter bendamustinformuleringer for lyofilisering som inkluderer en eksipient og en stabiliserende konsentrasjon av et organisk løsningsmiddel. En foretrukket formulering inkluderer bendamustin i en konsentrasjon på omtrent 15 mg/ml, mannitol i en konsentrasjon på omtrent 25,5 mg/ml, tertiær-butylalkohol i en konsentrasjon på omtrent 30 % volum/volum og vann. Inkludert i denne utførelsesformen av oppfinnelsen er lyofiliserte preparater dannet fra slike bendamustinformuleringer.

Fremgangsmåter for behandling av en medisinsk tilstand i en pasient er beskrevet som involverer administrering av en terapeutisk effektiv mengde av en farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen, hvor tilstanden er mottakelig for behandling med nevnte farmasøytiske sammensetning. Noen tilstander anvendbare for behandling med sammensetningene ifølge oppfinnelsen inkluderer kronisk lymfocytisk leukemi (CLL), Hodgkins sykdom, non-Hodgkins lymfom (NHL), multippel myelom (MM), brystcancer, small cell lungecancer, hyperproliferative forstyrrelser og autoimmun sykdom. Foretrukne tilstander inkluderer NHL, CLL, brystcancer og MM. Foretrukne autoimmune sykdommer inkluderer reumatoid artritt, multippel sklerose eller lupus.

Anvendelse av de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen er beskrevet for fremstilling av et medikament for behandling av en medisinsk tilstand, som definert heri, i en pasient som involverer administrering av en terapeutisk effektiv mengde av en farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen hvor tilstanden er mottakelig for behandling med nevnte farmasøytiske sammensetning.

Fremgangsmåter for behandling er beskrevet hvor de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen er i kombinasjon med én eller flere anti-neoplastiske midler hvor det anti-neoplastiske midlet blir gitt før, samtidig med eller etter administrering av den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen. Foretrukne anti-neoplastiske midler er antistoffer spesifikke for CD20. En farmasøytisk doseringsform av bendamustin er beskrevet som inneholder ikke mer enn omtrent 0,5 % til omtrent 0,9 %, fortrinnsvis 0,5 %, HP1 (areal% av

bendamustin) hvor nevnte doseringsform omfatter en ampulle eller annen farmasøytisk akseptabel beholder, hvor nevnte HP1 er mengden av HP1 tilstede før rekondisjonering eller ved tid null etter rekondisjonering av nevnte doseringsform. Foretrukne konsentrasjoner av bendamustin inkluderer omtrent 10 til omtrent 50 mg/holder, omtrent 100 mg/holder, omtrent 5 mg til omtrent 2 g/holder og omtrent 170 mg/holder.

Foreliggende oppfinnelse inkluderer prelyofiliserte farmasøytiske sammensetninger av bendamustin. I en foretrukket prelyofilisert sammensetning inkluderer bendamustin HCl omtrent 15 mg/ml, mannitol omtrent 25,5 mg/ml, omtrent 30 % volum/volum tertiær-butylalkohol og vann.

Disse og andre utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er beskrevet nedenfor eller fremgår klart for fagfolk innenfor dette området basert på følgende beskrivelser.

### 15 **Kort beskrivelse av tegningene**

Fig. 1 viser oppløseligheten av bendamustin ved forskjellige temperaturer for to forskjellige løsninger av bendamustin i tertiær-butanol.

Fig. 2 viser renhetsresultatene til en HPLC-analyse etter inkubering av bendamustin i forskjellige alkoholer i 24 timer ved 5°C. Resultatene er presentert som areal% av bendamustintoppen.

Fig. 3 viser HP1 (formel II) dannelse etter 24 timer i forskjellige alkohol/vann ko-løsningsmidler ved 5°C.

Fig. 4 viser dimer (formel III) formulering etter 24 timer i forskjellige alkohol/vann ko-løsningsmidler ved 5°C.

Fig. 5 viser en lyofiliseringssyklus for bendamustin ved anvendelse av et TBA/vann ko-løsningsmiddel.

Fig. 6 viser et kromatogram for Ribomustin® ved anvendelse av HPLC-metode nr. 1.

### 30 **Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen**

Som anvendt heri refererer betegnelsen "formulat" til fremstillingen av et medikament, f.eks., bendamustin, i en form egnet for administrering til en

pattedyrpasient, fortrinnsvis et menneske. Følgelig kan "formulering" inkludere tilsetning av farmasøytisk akseptable eksipienter, fortynningsmidler eller bærere.

Som anvendt heri refererer betegnelsen "lyofilisert pulver" eller "lyofilisert preparering" til et hvilket som helst fast materiale oppnådd ved lyofilisering, dvs. frysetørking av en vandig løsning. Den vandige løsningen kan inneholde et ikke-vandig løsningsmiddel, dvs. en løsning bestående av vandig og/eller én eller flere ikke-vandige løsningsmiddel(ler). En lyofilisert preparering er fortrinnsvis én hvor det faste materialet blir oppnådd ved frysetørking av en løsning bestående av vandige og én eller flere ikke-vandige løsningsmidler, mer foretrukket er det ikke-vandige løsningsmidlet en alkohol.

Med "stabil farmasøytisk sammensetning" menes en hvilken som helst farmasøytisk sammensetning som har tilstrekkelig stabilitet slik at det kan anvendes som et farmasøytisk produkt. Det er foretrukket at en stabil farmasøytisk sammensetning har tilstrekkelig stabilitet for å muliggjøre lagring ved en hensiktsmessig temperatur, fortrinnsvis mellom  $-20^{\circ}\text{C}$  og  $40^{\circ}\text{C}$ , mer foretrukket omtrent  $2^{\circ}\text{C}$  til omtrent  $30^{\circ}\text{C}$ , i en passelig tidsperiode, f.eks. hylletid til produktet som kan være så kort som 1 måned, men er typisk 6 måneder eller lengre, mer foretrukket 1 år eller lengre, enda mer foretrukket 24 måneder eller lengre, og enda mer foretrukket er 36 måneder eller lengre. Hylletiden eller utløp kan være den tidsmengden hvor det aktive ingredienset degraderes til et punkt under 90 % renhet. For formålet av foreliggende oppfinnelse inkluderer stabil farmasøytisk sammensetning referanse til farmasøytiske sammensetninger med spesifikke områder med urenheter som beskrevet heri. Fortrinnsvis utgjør en stabil farmasøytisk sammensetning én som har minimal nedbrytning av det aktive ingredienset, f.eks. har beholdt minst omtrent 85 % av udegradert aktivt middel, fortrinnsvis minst omtrent 90 % og mer foretrukket minst omtrent 95 %, etter lagring ved  $2-30^{\circ}\text{C}$  i en tidsperiode på 2-3 år.

Med "stabil lyofilisert preparering" menes en hvilken som helst lyofilisert preparering som har tilstrekkelig stabilitet, og en slik karakteristikk blir likeledes definert heri for en stabil farmasøytisk sammensetning ved anvendelse som et farmasøytisk produkt.

Med "degradert" menes at det aktive midlet har gjennomgått en forandring i kjemisk struktur.

Betegnelsen "terapeutisk effektiv mengde" som anvendt heri refererer til den mengden av forbindelsen som blir administrert som vil lindre i en viss grad ett eller flere av symptomene på forstyrrelsen som blir behandlet. Med referanse til behandling av neoplasmer refererer en terapeutisk effektiv mengde til den

5 mengden som har effekten av (1) redusering av størrelsen på tumoren, (2) inhibering (dvs. redusere i en viss grad, fortrinnsvis stopping) av tumormetastase, (3) inhibering i en viss grad (dvs., redusere i en viss grad, fortrinnsvis stopper) tumorveksten, og/eller, (4) lindring i en viss grad (eller, fortrinnsvis, eliminering) ett eller flere symptomer assosiert med cancer. Terapeutisk effektiv mengde kan også

10 bety forebygging av sykdommen fra å oppstå i et dyr som kan være predisponert for sykdommen men som ikke enda opplever eller utviser symptomer på sykdommen (profylaktisk behandling). Videre kan terapeutisk effektiv mengde være den mengden som øker livsforventningene til en pasient påvirket med en terminal forstyrrelse. Typiske terapeutisk effektive doser for bendamustin for

15 behandling av non-Hodgkins lymfom kan være fra omtrent 60-120 mg/m<sup>2</sup> gitt som en enkelt dose på to følgende dager. Syklusen kan bli gjentatt omtrent hver tredje til fjerde uke. For behandling av kronisk lymfatisk leukemi (CLL) kan bendamustin bli gitt med omtrent 80-100 mg/m<sup>2</sup> på dagene 1 og 2. Syklusen kan gjentas etter omtrent fire uker. For behandling av Hodgkins sykdom (stadiene II-IV) kan

20 bendamustin bli gitt i "DBVBe-regimer" med daunorubicin 25 mg/m<sup>2</sup> på dagene 1 og 15, bleomycin 10 mg/m<sup>2</sup> på dagene 1 og 15, vinkristin 1,4 mg/m<sup>2</sup> på dagene 1 og 15, og bendamustin 50 mg/m<sup>2</sup> på dagene 1-15 med gjentakelse av syklusen omtrent hver fjerde uke. For brystcancer kan bendamustin (120 mg/m<sup>2</sup>) på dagene 1 og 8 bli gitt i kombinasjon med metotreksat 40 mg/m<sup>2</sup> på dagene 1 og 8, og 5-

25 fluoruracil 600 mg/m<sup>2</sup> på dagene 1 og 8 med gjentakelse av syklusen omtrent hver fjerde uke. Som andreinjeterapi for brystcancer kan bendamustin bli gitt ved omtrent 100-150 mg/m<sup>2</sup> på dagene 1 og 2 med gjentakelse av syklusen omtrent hver fjerde uke.

Som anvendt heri refererer "neoplastisk" til en neoplasme, som er en

30 unormal vekst, idet slik vekst oppstår på grunn av en proliferasjon av cellene når ikke utsatt for uvanlige begrensninger av veksten. Som anvendt heri er "anti-neoplastisk middel" en hvilken som helst forbindelse, sammensetning,

sammenblanding, ko-blanding eller blanding som hemmer, eliminerer, reduserer eller reverserer den neoplastiske fenotypen til en celle.

Som anvendt heri er "hyperproliferasjon" overproduksjon av celler i respons til en bestemt vekstfaktor. "Hyperproliferative forstyrrelser" er sykdommer hvor celler overproduserer i respons til en spesiell vekstfaktor. Eksempler på slike "hyperproliferative forstyrrelser" inkluderer diabetisk retinopati, psoriasis, endometriose, cancer, makulære degenerative forstyrrelser og benigne vekstforstyrrelser så som prostataforstørrelse.

Som anvendt heri refererer "beholder" til en hvilken som helst beholder med vegg, enten faste eller fleksible.

"Kontrollering" som anvendt heri betyr å tilveiebringe prosesskontroller på plass for å lette oppnåelse av det som skal bli kontrollert. F.eks., i et gitt tilfelle, kan "kontrollering" bety testing av prøver fra hvert parti eller et antall partier jevnlig eller tilfeldig; innstilling av konsentrasjonen til nedbrytningsmidlene som en frigjøringsspesifikasjon; og av prosessbetingelser, f.eks. anvendelse av alkoholer og/eller andre organiske løsningsmidler i prelyofiliseringsløsningen eller dispersjonen, for å forsikre at konsentrasjonen av nedbrytningsmidlene av det aktive ingredienset ikke er uakseptabel; osv. Kontrollering for nedbrytningsmidler ved å innstille frigjøringsspesifikasjoner for den mengden av nedbrytningsmidler som kan bli anvendt for å lette myndighetsgodkjenning av et farmasøytisk produkt av en regulerende myndighet, så som U.S. Food and Drug Administration og lignende myndigheter i andre land eller regioner ("myndighet").

Betegnelsen "farmasøytisk akseptabel" som anvendt heri betyr at den gjenstanden som er farmasøytisk akseptabel, f.eks., komponentene, inkludert beholdere, av en farmasøytisk sammensetning, forårsaker ikke uakseptabelt tap av farmakologisk aktivitet eller uakseptable negative bivirkninger. Eksempler på farmasøytisk akseptable komponenter er gitt i The United States Pharmacopeia (USP), The National Formulary (NF), tilpasset til United States Pharmacopeial Convention, holdt i Rockville, Md. i 1990 og FDA Inactive Ingredient Guide 1990, 1996 utstedt av the U.S. Food and Drug Administration (begge er heri inkorporert som referanse, inkludert eventuelle tegninger). Andre grader av løsninger eller komponenter som oppfyller de nødvendige grensene og/eller spesifikasjonene som er utenfor USP/NF kan også bli anvendt.

Betegnelsen "farmasøytisk sammensetning" som anvendt heri skal bety en sammensetning som blir dannet under betingelser som er egnede for administrering til mennesker, f.eks., det blir dannet under GMP-betingelser og inneholder farmasøytisk akseptable eksipienter, f.eks., uten begrensning, stabiliseringsmidler, bulkmidler, buffere, bærere, fortynningsmidler, vehikler, oppløsningsmidler og bindemidler. Som anvendt heri inkluderer farmasøytisk sammensetning, men er ikke begrenset til, en prelyofiliseringsløsning eller dispersjon samt en flytende form klar for injeksjon eller infusjon etter rekondisjonering av et lyofilisert preparat.

En "farmasøytisk doseringsform" som anvendt heri betyr at de farmasøytiske sammensetningene beskrevet heri er i en beholder og i en mengde egnet for rekondisjonering og administrering av én eller flere doser, typisk omtrent 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-10 eller omtrent 1-20 doser. Det er foretrukket at en "farmasøytisk doseringsform" som anvendt heri betyr en lyofilisert farmasøytisk sammensetning beskrevet heri i en beholder og i en mengde egnet for rekondisjonering og levering av én eller flere doser, typisk omtrent 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-10 eller omtrent 1-20 doser. Den farmasøytiske doseringsformen kan omfatte en beholder eller sprøyte eller en annen egnet farmasøytisk akseptabel beholder. Farmasøytisk doseringsform egnet for injeksjon eller infusjonsbruk kan inkludere sterile vandige løsninger eller dispersjoner eller sterile pulvere omfattende et aktivt ingrediens som er tilpasset for ekstemporær preparering av det sterile injeksjonsløsningen eller infuserbare løsninger eller dispersjoner. I alle tilfeller skal den ultimate doseringsformen være steril, fluid og stabil under fremstilling og lagring. Den flytende bæreren eller vehikkelen kan være et løsningsmiddel eller flytende dispersjonsmedium omfattende, f.eks., vann, etanol, en polyol så som glyserol, propylenglykol eller flytende etylenglykoler og lignende, vegetabiliske oljer, ikke-toksiske glyserylestere og egnede blandinger derav. Forebygging av ekstra mikroorganismer kan bli oppnådd ved forskjellige antibakterielle og antisoppmidler, f.eks., parabener, klorbutanol, fenol, sorbinsyre, timerosal og lignende.

Som anvendt heri betyr betegnelsen "eksipient" substansene anvendt for å formulere aktive farmasøytiske ingredienser (API) i farmasøytiske formuleringer; i en foretrukket utførelsesform, vil en eksipient ikke redusere eller interferere med

dem primære terapeutiske effekten til API. Det er foretrukket at en eksipient er terapeutisk inert. Betegnelsen "eksipient" omfatter bærere, fortynningsmidler, vehikler, oppløsningsmidler, stabiliseringsmidler, bulkmidler og bindemidler. Eksipienter kan også være de substansene som er tilstede i en farmasøytisk formulering som et indirekte eller ikke tilsiktet resultat av fremstillingsprosessen. Fortrinnsvis blir eksipientene godkjent for eller betraktet å være trygge for administrering til mennesker og dyr, dvs. GRAS-substanser (generelt ansett som trygge). GRAS-forbindelser er oppført av Food and Drug Administration i Code of Federal Regulations (CFR) ved 21 CFR § 182 og 21 CFR § 184. I sammensetningen ifølge den foreliggende oppfinnelsen anvendes mannitol som eksipient.

Som anvendt heri betyr "en stabiliserende konsentrasjon av et organisk løsningsmiddel" eller "en stabiliserende konsentrasjon av en alkohol" at mengden av et organisk løsningsmiddel eller alkohol kan redusere nivået av nedbrytning av bendamustin for å oppnå et spesifisert nivå av nedbrytningsmidler i det endelige medikamentproduktet. F.eks., med hensyn på degradant HP1, er en stabiliserende konsentrasjon av et organisk løsningsmiddel den mengden som resulterer i en HP1-konsentrasjon (areal% av bendamustin) på mindre enn omtrent 0,5 %, fortrinnsvis mindre enn 0,45 %, fortrinnsvis mindre enn 0,40 %, mer foretrukket mindre enn 0,35 %, mer foretrukket mindre enn 0,30 % og enda mer foretrukket mindre enn 0,25 %. Med hensyn til helhetlige eller totale nedbrytningskonsentrasjonen til et endelig medikamentprodukt er den stabiliserende konsentrasjonen av et organisk løsningsmiddel den mengden som resulterer i en total nedbrytningsmiddelkonsentrasjon (ved tidspunkt for medikamentproduktfrigjøring) på mindre enn omtrent 7 % (areal% bendamustin), fortrinnsvis mindre enn omtrent 6 %, mer foretrukket mindre enn omtrent 5 % og enda mer foretrukket mindre enn omtrent 4,0 %. Ved "areal% av bendamustin" menes mengden av et spesifikt nedbrytningsmiddel, f.eks., HP1, relativt til mengden av bendamustin som bestemt, f.eks. ved HPLC.

Betegnelsen "organisk løsningsmiddel" betyr et organisk materiale, vanligvis en væske, som har evne til å oppløse andre forbindelser.

Som anvendt heri betyr "spormengder av et organisk løsningsmiddel" en mengde av løsningsmidlet som er lik eller under de anbefalte nivåene for

farmasøytiske produkter, f.eks., som anbefalt av ICH-retningslinjene (International Conferences on Harmonization, Impurities - Guidelines for Residual Solvents. Q3C. Federal Register. 1997; 63(247):67377. Den lavere grensen er den laveste mengden som kan bli detektert.

5            Betegnelsen "frigjøring" eller "ved frigjøring" betyr at medikamentproduktet har oppfylt frigjøringsspesifikasjonene og kan bli anvendt for det tilsiktede farmasøytiske formålet.

#### A. Generelt

10            Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer stabile, farmasøytisk akseptable sammensetninger fremstilt fra bendamustin. Spesielt tilveiebringer oppfinnelsen formuleringer for lyofilisering av bendamustin HCl. Det lyofiliserte pulveret oppnådd fra slike formuleringer blir lettere gjenopprettet enn det for tiden tilgjengelige lyofiliserte pulveret av bendamustin. Videre har de lyofiliserte  
15            produktene ifølge foreliggende oppfinnelse en bedre renhetsprofil en Ribomustin® med hensyn til visse urenheter, spesielt HP1, bendamustindimer og bendamustintylester, før rekondisjonering, ved lagring av det lyofiliserte produktet eller rekondisjonering og samblending.

20            Sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan anvendes for behandling av neoplastiske sykdommer. Sammensetningene beskrevet heri kan bli administrert alene eller i kombinasjon med minst ett ytterligere anti-neoplastisk middel og/eller radioaktiv terapi.

Tilstander og metoder for å øke stabiliteten av bendamustin før og i løpet av lyofiliseringsprosessen, ved hyllelagring eller ved rekondisjonering, er beskrevet.

25            Anti-neoplastiske midler som kan bli anvendt i kombinasjon med sammensetningene ifølge oppfinnelsen inkluderer dem som er gitt i Merck Index 11, s. 16-17, Merck & Co., Inc. (1989) og The Chemotherapy Source Book (1997). Begge bøkene er meget anerkjente og lett tilgjengelige for fagfolk innenfor dette  
30            området. Det er et stort antall av antineoplastiske midler tilgjengelige for kommersiell bruk, i klinisk vurdering og i pre-klinisk utvikling, som kan bli valgt for behandling av neoplasi ved kombinasjonsmedikamentkjemoterapi. Slike anti-neoplastiske midler faller inn i flere hovedkategorier, dvs., anti-myotisk-type midle, antimetabolittmedikamenter, hormonelle midler, inkludert glukokortikoider så som

prednison og deksametason, immunologiske midler, interferon-type midler, differensieringsmidler så som retinoider, pro-apoptotiske midler og en kategori av forskjellige midler, inkludert forbindelsen så som antisens, små interfererende RNA og lignende. Alternativt kan andre anti-neoplastiske midler så som  
 5 metallomatriksproteaser (MMP) inhibitorer, SOD-etterligninger eller alfa<sub>v</sub>beta<sub>3</sub>-inhibitorer bli anvendt.

En familie av antineoplastiske midler som kan bli anvendt i kombinasjon med forbindelsene består av antimetabolitt-type antineoplastiske midler. Egnede antimetabolitt antineoplastiske midler kan bli valgt fra gruppen bestående av  
 10 alanosin, AG2037 (Pfizer), 5-FU-fibrinogen, akantifolsyre, aminotiadiazol, brequinarnatrium, karmofur, Ciba-Geigy CGP-30694, syklopentylcytosin, cytarabinfosfatstearat, cytarabinkonjugater, Lilly DATHF, Merrel Dow DDFC, doksifluridin, Wellcome EHNA, Merck & Co. EX-015, fazarabin, floksuridin, fludarabinfosfat, 5-fluoruracil, N-(2'-furanidyl)-5-fluoruracil, Diichi Seiyaku FO-152,  
 15 isopropylpyrrolizin, Lilly LY-188011, Lilly LY.264618, metobenzaprim, metotreksat, Wellcome MZPES, norspermidin, NCI NSC-127716, NCI NSC-264880, NCI NSC-39661, NCI NSC-612567, Warner-Lambert PALA, pentostatin, piritreksim, plikamycin, Asahi Chemical PL-AC, Takeda TAC-788, tioguanin, tiazofurin, Erbamont TIF, trimetreksat, tyrosinkinaseinhibitorer,  
 20 tyrosinproteinkinaseinhibitorer, Taiho UFT og uricytin.

En annen familie av antineoplastiske midler som kan bli anvendt i kombinasjon med forbindelsene består av kovalente DNA-bindende midler. Egnede alkyleringstype antineoplastiske midler ble valgt fra gruppen bestående av  
 25 Shionogi 254-S, aldo-fosfamidanaloger, altretamin, anaksiron, Boehringer Mannheim BBR-2207, bestrabucil, budotitan, Wakunaga CA-102, karboplatin, karmustin, Chinoin-139, Chinoin-153, klorambucil, cisplatin, syklofosfamid, American Cyanamid CL-286558, Sanofi CY-233, cyplatat, Degussa D-19-384, Sumimoto DACHP(My<sub>r</sub>)<sub>2</sub>, difenylspiomustin, diplatinum cytostatika, Erba distamycinderivater, Chugai DWA-2114R, ITI E09, elmustin, Erbamont FCE-  
 30 24517, estramustinfosfatnatrium, fotemustin, Unimed G-6-M, Chinoin GYKI-17230, hepsul-fam, ifosfamid, iproplatin, lomustin, mafosfamid, melfalan, mitolaktol, Nippon Kayaku NK-121, NCI NSC-264395, NCI NSC-342215, oksaliplatin, Upjohn PCNU, prednimustin, Proter PTT-119, ranimustin, semustin, SmithKline SK&F-

101772, Yakult Honsha SN-22, spiromustin, Tanabe Seiyaku TA-077, tauromustin, temozolomid, teroksiron, tetraplatin og trimelamol.

En annen familie av antineoplastiske midler som kan bli anvendt i kombinasjon med forbindelsene beskrevet heri består av antibiotika-type antineoplastiske midler. Egnede antibiotika-type antineoplastiske midler kan bli valgt fra gruppen bestående av Taihi 4181-A, akklarubicin, aktinomycin D, aktinoplanon, alanosin, Erbamont ADR-456, aeroplysininderivat, Ajinomoto AN-201-II, Ajinomoto AN-3, Nippon Soda anisomiciner, antrasyklin, azino-mycin-A, biskaberin, Bristol-Myers BL-6859, Bristol-Myers BMY-25067, Bristol-Myers BMY25551, Bristol-Myers BMY-26605, Bristol-Myers BMY-27557, Bristol-Myers BMY28438, bleomycinsulfat, bryostatin-1, Taiho C-1027, kalichemycin, kromoksimycin, daktinomycin, daunorubicin, Koywa Hakko DC-102, Kyowa Hakko DC-79, Kyowa Hakko DC-88A, Kyowa Hakko DC89-A1, Kyowa Hakko DC92-B, ditrisarubicin B, Shionogi DOB-41, doksorubicin, doksorubicin-fibrinogen, elsamicin-A, epirubicin, erbstatin, esorubicin, esperamicin-A1, esperamicin-Alb, Erbamont FCE-21954, Fujisawa FK-973, fostriecin, Fujisawa FR-900482, glidobaktin, gregatin-A, grinkamycin, herbimycin, idarubicin, illudins, kazysamycin, kesarirhodins, Kyowa Hakko KM-5539, Kirin Brewery KRN-8602, Kyowa Hakko KT-5432, Kyowa Hakko KT-5594, Kyowa Hakko KT-6149, American Cyanamid LL-D49194, Meiji Seika ME 2303, menogaril mitomycin, mitoksantron, SmithKline M-TAG, neoenaktin, Nippon Kayaku NK-313, Nippon Kayaku NKT-01, SRI International NSC-357704, oksalysin, oksaunomycin, peplomycin, pilatin, pirarubicin, protramycin, pyrindamycin A, Tobishi RA-I, ramapycin, rizoksin, rodo-rubicin, sibanomicin, siwenmycin, Sumitomo SM-5887, Snow Brand SN-706, Snow Brand SN-07, sorangicin-A, sparsomycin, SS Pharmaceutical SS-21020, SS Pharmaceutical SS-7313B, SS Pharmaceutical SS-9816B, steffimycin B, Taiho 4181-2, talisomycin, Takeda TAN 868A, terpentecin, trazin, trikorazin A, Upjohn U-73975, Kyowa Hakko UCN-10028A, Fujisawa WF-3405, Yoshitomi Y-25024 og zorubicin.

En fjerde familie av antineoplastiske midler som kan bli anvendt i kombinasjon med forbindelsene inkluderer en forskjelligartet familie av antineoplastiske midler valgt fra gruppen bestående av alfa-karoten, alfa-difluormetylarginin, acitretin, arsenetrioksid, Avastin® (bevacizumab), Biotec AD-5,

Kyorin AHC-52, alstonin, amonafid, amfetinil, amsakrin, angiostat, ankinomycin, anti-neoplaston A 10, antineoplaston A2, antineoplaston A3, antineoplaston A5, antineoplaston AS2-1, Henkel APD, afidikolinglysinat, asparaginase, Avarol, bakkarin, batracylin, benfluron, benzotript, Ipsen-Beaufour BIM-23015, bisantren, Bristol-Myers BMY-40481, Vestar boron-10, bromfosamid, Wellcome BW-502, Wellcome BW-773, karacemid, karmetizol, hydroklorid, Ajinomoto CDAF, klorsulfakinoksalon, Chemes CHX-2053, Chemex CHX-100, Warner-Lambert CI-921, Warner-Lambert CI-937, Warner-Lambert CI-941, Warner-Lambert CI-958, klanfenur, klaviridon, ICN forbindelse 1259, ICN forbindelse 4711, Contractan, Yakult Honsha CPT-11, kristanol, kuraderm, cytokalasin B, cytarabin, cytocytin, Merz D-609, DABIS-maleat, dakarbazin, datelliptinium, didemnin-B, dihematoporfyrineter, dihydrolenperon, dinalin, distamycin, Toyo Pharmar DM-341, Toyo Pharmar DM-75, Daiichi Seiyaky DN-9693, elliprabin, elliptiniumacetat, epothionesTsumura EPMTc, erbituks, ergotamin, erlotnib, etoposid, etretinat, fenretnind, Fujisawa FR-57704, galliumnitrat, genkwadafin, Gleevec® (imatnib), Chugai GLA-43, Glaxo GR-63178, gefitinib, grifolan NMF-5N, heksdecylfosfocholin, Green Cross HO-211, homoharringtonin, hydroksyurea, BTG ICRF-187, indanocin, ilmofosin, isoglutamin, siotretionin, Otsuka JI-36, Ramot K-477, Otsuak K-76COONa, Kureha Chemical K-AM, MECT Corp KI-8110, American Cyanamid L-623, Leukoregulin, Ionidamin, Lundbeck LU-23-112, Lilly LY-186641, NCI (US) MAP, marycin, meflokin, Merrel Dow MDL-27048, Medco MEDR-340, merbaron, merocyaninderivater, metylanilinoakridin, Molecular Genetics MGI-136, minaktivin, mitonfafid, mitokidon, mopidamil, motretinid, Zenyaku Kogyo MST-16, N-(retinoyl)aminosyrer, Nisshin Flour Milling N-021, N-acetylert-dehydroalaniner, nafazatrom, Taisho NCU-190, nokdazolderivater, Normosang, NCI NSC-145813, NCI NSC-361456, NCI NSC-604782, NCI NSC-95580, oktreetid, Ono ONO-112, okizanocin, Akzo Org-10172, paclitaxel, pankrastatin, pazelliptin, Warner-Lambert PD-111707, Warner-Lambert PD-115934, Warner-Lambert PD-131141, Pierre Fabre PE-1001, ICRT peptid D, piroksantron, polyhematoporfyrin, polypreinsyre, Efamol porfyrin, probiman, prokarbazin, proglumid, Invitron proteaseneksin I, Tobishi RA-700, razoksan, Sapporo Breweries RBS, restriktin-P, ratelliptin, retinolsyre, Rhone-Poulence RP-49532, Rhone-Poulenc RP-56976, Rituxan® (og andre anti-CD-20-antistoffer,

f.eks. Bexxar<sup>®</sup>, Zevalin<sup>®</sup>), SmithKline SK&F-104864, statins (Lapitor<sup>®</sup> etc.), Sumitomo SM-108, Kuraray SMANCS, SeaPharm SP-10094, spatol, spirocyklopropanderivater, spirogermanium, Unimed, SS Pharmaceutical SS-554, strypoldinon, Stypoldion, Suntory SUN 0237, Suntory SUN-2071, 5 superoksidismutase, talidomid, talidomidanaloger, Toyama T-506, Toyama T-680, taksol, Teijin TEI-0303, teniposid, taliblastin, Eastman Kodak TJB-29, tokotrienol, topostin, Teijin TT-82, Kyowa Hakko UCN-01, Kyowa Hakko UCN-1028, ukrain, Eastman Kodak USB-006, vinblastinsulfat, vinkristin, vindesin, vinestramid, vinorelbin, vintriptol, vinzolidin, withanolider og Yamanouchi YM-535, 10 Zometa<sup>®</sup>.

Eksempler på radiobeskyttende midler som kan bli anvendt i kombinasjonskjemoterapi er AD-5, adknon, amifostinanaloger, detoks, dimesna, 1-102, MM-159, N-acetyllert-dehydroalaniner, TGF-Genentech, tiprotimod, amifostin, WR-151327, FUT-187, ketoprofentransdermal, nabumeton, superoksid dismutase 15 (Chiron og Enzon).

Fremgangsmåter for fremstilling av antineoplastiske midler beskrevet ovenfor kan finnes i litteraturen. Fremgangsmåter for fremstilling av doksorubicin er f.eks. beskrevet i US patent nr. 3 590 028 og 4 012 448. Metoder for fremstilling av metallomatriksproteaseinhibitorer er beskrevet i EP 780386. Fremgangsmåter 20 for fremstilling av alfavbeta<sub>3</sub>-inhibitorer er beskrevet i WO 97/08174.

Foretrukne anti-neoplastiske midler inkluderer, uten begrensning, én eller flere av daunorubicin, bleomycin, vinkristin, doksorubicin, dakarbazin, prednisolon, mtioksantron, prednison, metotreksat, 5-fluoruracil, deksametason, talidomid, talidomidderivater 2ME2, Neovastat, R 11 5777, arsenetrioksid, bortezomib, 25 tamoksifen, G3139 (antisens) og SU5416, mitomycin, anti-CD20-antistoffer, så som Rituxan<sup>®</sup> og R-etodolac.

Foretrukne medikamentregimer som foreliggende formulering kan bli anvendt sammen med eller som en erstatning for én eller flere av komponentene inkluderer, uten begrensning, ABVD (doksorubicin, bleomycin, vinkristin, 30 dakarbazin), DBV (daunorubicin, bleomycin, vinkristin), CVPP (syklofosfamid, vinblastin, prokarbazin, prednisolon), COP (syklofosfamid, vinkristin, prednisolon), CHOP (syklofosfamid, doksorubicin, vinkristin og prednison) og CMF

(syklofosamid, metotreksat, 5-fluoruracil). Ytterligere regimer er gitt i tabell A nedenfor.

**Tabell A - Cancerterapeutiske regimer**

<b>Forkortelser</b>	<b>Medikamenter anvendt</b>	<b>Sykdom</b>
AC	Doksorubicin & syklofosamid	Brystcancer
CFM (CF, FNC)	Syklofosamid, fluoracil, mitoksantron	Brystcancer
CMF	Syklofosamid, metotreksat, fluoruracil	Brystcancer
NFL	Mitoksantron, fluoruracil, leukovorin	Brystcancer
Sekvensiell Dox-CMF	Doksorubicin	Brystcancer
VATH	Vinblastin, doksorubicin, tiotepa, fluoksymesteron	Brystcancer
EMA-86	Etoposid, mitoksantron, cytarabin	AML (induksjon)
7 + 3	Cytarabin WITH Daunorubicin OR Idarubicin OR Mitoksantron	AML (induksjon)
5 + 2	Cytarabin WITH Daunorubicin OR Mitoksantron	AML (induksjon)
HiDAC	Cytarabin	AML (post-remisjon)
ABVD	Doksorubicin, bleomycin, vinblastin, dakarbazin	Hodgkins
ChIVPP	Klorambucil, vinblastin, prokarbazin, prednison	Hodgkins
EVA	Etoposid, vinblastin, doksorubicin	Hodgkins

MOPP	Metkloretamin, vinkristin, prokarbazin, prednison	Hodgkins
MOPP/ABV hybrid	Mekloretamin, vinkristin, prokarbazin, prednison, doksorubicin, bleomycin, vinblastin	Hodgkins
MOPP/ABVD	Mekloretamin, doksorubicin, vinblastin, bleomycin, etopsid, prednison	Hodgkins
CNOP	Syklofosfamid, mitoksantron, vinkristin, prednison	Non-Hodgkins
COMLA	Syklofosfamid, vinkristin, metotreksat, leukovorin, cytarabin	Non-Hodgkins
DHAP	Deksametason, cisplatin, cytarabin	Non-Hodgkins
ESHAP	Etopsid, metylprednisilon, cisplatin, cytarabin	Non-Hodgkins
MACOP-B	Metotreksat, leukovorin, doksorubicin, syklofosfamid, vinkristin, prednison, bleomycin, sepra, ketokonazol	Non-Hodgkins
m-BACOD	Metotreksat, leukovorin, bleomycin, doksorubicin, syklofosfamid, vinkristin, deksametason	Non-Hodgkins
MINE-ESHAP	Mesna, Ifosfamid, mitoksantron, etopsid	Non-Hodgkins

NOVP	Mitoksantron, vinblastin, prednison, vinkristin	Non-Hodgkins
ProMACE/cytaBOM	Prednison, Doksorubicin, syklofosamid, etopsid, cytarabin, bleomycin, vinkristin, metotreksat, leukovorin, septra	Non-Hodgkins
M2	Vinkristin, karmustin, syklofosamid, melfalan, prednison	Multippelt myelom
MP	Melfalan, prednison	Multippelt myelom
VAD	Vinkristin, doksorubicin, deksametason	Multippelt myelom
VBMCP	Vinkristin, karmustin, melfalan, syklofosamid, prednison	Multippelt myelom

Som beskrevet heri blir en lyofilisert formulering av bendamustin oppnådd etter fjerning av et organisk løsningsmiddel i vann. Løsningsmiddelet anvendt for å fremstille formuleringen ifølge oppfinnelsen er tertiær butanol (TBA). Andre organiske løsningsmidler kan bli anvendt som inkluderer etanol, n-propanol, n-butanol, isopropanol, etylacetat, dimetylkarbonat, acetonitril, diklormetan, metyletylketon, metylisobutylketon, aceton, 1-pentanol, metylacetat, metanol, karbontetraklorid, dimetylsulfoksid, heksafluoracetone, klorbutanol, dimetylsulfon, eddiksyre, sykloheksan. Disse foregående løsningsmidlene kan bli anvendt i kombinasjon med tertiær butanol. Nyttige løsningsmidler må danne stabile løsninger med bendamustin og må ikke i betydelig grad nedbryte eller deaktivere API. Oppløseligheten av bendamustin i det valgte løsningsmidlet må være høy nok for å danne kommersielt nyttige konsentrasjoner av medikamentet i løsningsmidlet. I tillegg bør løsningsmidlet ha evne til å bli lett fjernet fra en vandig dispersjon eller løsning av medikamentproduktet, f.eks. gjennom lyofilisering eller vakuumbørking. Det er foretrukket at en løsning som har en konsentrasjon på

omtrent 2-80 mg/ml, fortrinnsvis omtrent 5-40 mg/ml, mer foretrukket 5-20 mg/ml og enda mer foretrukket 12-17 mg/ml bendamustin blir anvendt.

En farmasøytisk akseptabel lyofiliseringseksipient kan bli oppløst i den vandige fasen. Eksempler på nyttige eksipienter inkluderer, uten begrensning, natrium- eller kaliumfosfat, sitronsyre, vinsyre, gelatin, glysin og karbohydrater så som laktose, sukrose, maltose, glyserin, dekstrose, dekstran, trehalose og hetastarch. Mannitol er en eksipient som anvendes i sammensetningen ifølge oppfinnelsen. Andre eksipienter som om ønskelig kan bli anvendt inkluderer antioksidanter, så som, uten begrensning, askorbinsyre, acetylcystein, cystein, natriumhydrogensulfitt, butyl-hydroksyanisol, butyl-hydroksytoluen eller alfa-tokoferolacetat eller chelatorer.

En typisk formulering og lyofiliseringssyklus er gitt nedenfor. Lyofilisering kan bli utført ved anvendelse av standardutstyr som anvendt for lyofilisering eller vakuumbørking. Syklusen kan bli variert avhengig av utstyr og fasiliteter anvendt for fyllet/finishen.

En vandig prelyofiliseringsløsning eller dispersjon ifølge oppfinnelsen blir først formulert i en farmasøytisk akseptabel forbindelsesbeholder. Løsningen blir aseptisk filtrert i en steril beholder, fylt inn i en beholder med hensiktsmessig størrelse, delvis tildekket og plassert i en lyofilisator. Ved anvendelse av lyofiliseringsteknikker beskrevet heri blir løsningen lyofilisert til et fuktinnhold i området på omtrent 0,1 til omtrent 8,0 % blir oppnådd. Det resulterende lyofiliseringspulveret er stabilt som et lyofilisert pulver i omtrent 6 måneder til mer enn omtrent 2 år, fortrinnsvis mer enn omtrent 3 år ved omtrent 5°C til omtrent 25°C og kan lett bli gjenopprettet med sterilt vann for injeksjon, eller annen egnet bærer, for å tilveiebringe flytende formuleringer av bendamustin, egnet for indre administrering f.eks., ved parenteral injeksjon. For intravenøs administrering er den opprettede vandige formuleringen, dvs. den farmasøytiske sammensetningen, fortrinnsvis en løsning.

Prelyofiliseringsløsningen eller dispersjonen blir normalt først formulert i en farmasøytisk akseptabel beholder ved: 1) tilsetning av eksipient, så som mannitol (omtrent 0 til omtrent 50 mg/ml) med blanding til vann (omtrent 65 % av det totale volumet) ved omgivelsestemperatur, 2) tilsetning av et organisk løsningsmiddel (0,5-99,9 % vekt/vekt), så som TBA til den vandige løsningen med blanding ved

omtrent 20-35°C, 4) tilsetning av bendamustin HCl til ønsket konsentrasjon med blanding, 5) tilsetning av vann for å oppnå sluttvolumet, og 6) avkjøling av løsningen til omtrent 1°C til omtrent 30°C, fortrinnsvis omtrent 5°C. Til tross for at de foregående trinnene blir vist i en viss rekkefølge, er det underforstått at fagfolk innenfor dette området kan forandre rekkefølgen på trinnene og mengder etter behov. Mengder kan også bli fremstilt på vektbasis.

Prelyofiliseringsløsningen eller dispersjonen kan bli sterilisert før lyofilisering, og steriliseringen blir generelt utført ved aseptisk filtrering, f.eks. gjennom et 0,22 mikron eller mindre filter. Multiple steriliseringsfiltre kan bli anvendt. Sterilisering av løsningen eller dispersjonen kan bli oppnådd ved andre metoder kjent innenfor fagområdet, f.eks. bestråling.

I dette tilfellet er løsningen eller dispersjonen klar for lyofilisering etter sterilisering. Generelt vil den filtrerte løsningen bli introdusert i en steril mottakerbeholder, og deretter overført til en hvilken som helst egnet beholder eller beholdere hvor formuleringen kan bli effektivt lyofilisert. Vanligvis er formuleringen effektiv og blir effektivt lyofilisert i beholdere hvor produktet skal bli forhandlet, så som, uten begrensning, en beholder, som beskrevet heri og som kjent innenfor fagområdet.

En typisk prosedyre for anvendelse ved lyofilisering av pre-lyofiliseringsløsningen eller dispersjonene er angitt ytterligere nedenfor. Derimot vil en person innenfor dette fagområdet forstå at modifikasjoner i prosedyrene eller prosessene kan bli utført avhengig av slike ting som, men ikke begrenset til, pre-lyofiliseringsløsningen eller dispersjonen og utstyret for lyofilisering.

Innledningsvis blir produktet plassert i en lyofiliseringsbeholder under et område av temperaturer og deretter utsatt for temperaturer godt under frysepunktet til produktet og generelt i flere timer. Fortrinnsvis vil temperaturen være ved eller under omtrent -40°C i minst to timer. Etter at frysingen er fullført blir kammeret og kondensatoren evakuert gjennom vakuumpumper og kondensatoroverflaten er tidligere blitt avkjølt ved sirkulering av kuldemedium. Det er foretrukket at kondensatoren vil ha blitt avkjølt under frysepunktet til løsningen, fortrinnsvis til omtrent -40°C, mer foretrukket til omtrent -50°C eller lavere, enda mer foretrukket til omtrent -60°C eller lavere. I tillegg bør evakuering av kammeret

bli fortsatt helt til et trykk på omtrent 10 til omtrent 600 mikroner, fortrinnsvis omtrent 50 til omtrent 150 mikroner blir oppnådd.

Produktsammensetningen blir deretter varmet under vakuum i kammeret og kondensatoren. Dette blir vanligvis utført ved oppvarming av hyllene i lyofilisatoren  
5 hvor produktet hviler i løpet av lyofiliseringsprosessen ved et trykk varierende fra omtrent 10 til omtrent 600 mikron. Oppvarmingsprosessen vil optimalt foregå meget gradvis, i løpet av flere timer. F.eks. bør produkttemperaturen innledningsvis bli øket fra omtrent -30°C til omtrent -10°C og opprettholdt i omtrent 10-70 timer. I tillegg kan produkttemperaturen bli øket fra frysetemperaturen til  
10 omtrent 25-40°C over en periode på 30-192 timer. For å forebygge avgivelse av pulver fra lyofilisatet fra beholderne bør fullstendig fjerning av det organiske løsningsmidlet og vann bli utført i løpet av den opprinnelige tørkefasen. Fullstendig tørking kan bli bekreftet ved stabilisering av vakuum, kondensatortemperatur og produkthylletemperatur. Etter innledende tørking bør produkttemperaturen bli øket  
15 til omtrent 25-40°C og opprettholdt i omtrent 5-40 timer.

Når tørkesyklusen er fullført kan trykket i beholderen bli sakte forøket til atmosfærisk trykk (og litt under) med steril, tørr-nitrogengass (eller ekvivalent gass). Dersom produktsammensetningen er blitt lyofilisert i beholdere så som glass, kan glassene bli satt lokk på, fjernet og forseglet. Flere representative  
20 prøver kan bli fjernet for det formålet å utføre forskjellige fysiske, kjemiske og mikrobiologiske tester for å analysere kvaliteten av produktet.

Den lyofiliserte bendamustinformuleringen blir typisk markedsført i farmasøytisk dissosieringsform. Den farmasøytiske doseringsformen, til tross for typisk i form av en beholder, kan være en hvilken som helst egnet beholder, så  
25 som ampuller, sprøyter, ko-glass, som har evne til å opprettholde et sterilt miljø. Slike beholdere kan være av glass eller plast, forutsatt at materialet ikke reagerer med bendamustinformuleringen. Lukningen er typisk et lokk, mest typisk en steril gummipropp, fortrinnsvis et brombutylgummilokk, som gir en hermetisk forsegling.

Etter lyofilisering kan bendamustin lyofiliseringspulveret bli fylt i beholdere,  
30 så som glassbeholdere, eller alternativt kan pre-lyofiliseringsløsningen bli fylt i slike beholdere og lyofilisert deri, resulterende i beholdere som direkte inneholder den lyofiliserte bendamustinformuleringen. Slike beholdere blir, etter fylling eller lyofilisering av løsningen deri, forseglet, så som med et lokk, for å tilveiebringe en

forseglet, steril, farmasøytisk doseringsform. Typisk vil en beholder inneholde et lyofilisert pulver inkludert omtrent 10-500 mg/holder, fortrinnsvis omtrent 100 mg/holder, bendamustin og omtrent 5 mg-2 g beholder, fortrinnsvis omtrent henholdsvis 170 mg/holder mannitol.

5 De lyofiliserte formuleringene kan bli rekondisjonert med vann, fortrinnsvis sterilt vann for injeksjon, eller annet sterilt fluid så som ko-løsningsmidler, for å tilveiebringe en hensiktsmessig løsning av bendamustin for administrering, som ved parenteral injeksjon etter ytterligere fortykning i en hensiktsmessig intravenøs sammenblandingsskål, f.eks., normalt saltvann.

10

## B. Oppløselighet

Oppløseligheten til bendamustin HCl (bendamustin) i vann (alene) og med varierende mengder av alkoholer vanligvis anvendt i lyofilisering, f.eks. metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol og tertiær-butylalkohol (TBA) ble bestemt ved visuell inspeksjon. Mengder av bendamustin ved 15 mg/ml, kombinert med mannitol ved 25,5 mg/ml ble fremstilt i 10 ml av de indikerte alkoholløsningene ved romtemperatur (se tabell 1). Prøver ble deretter avkjølt ved 5°C og inspisert etter 0, 3, 6 og 24 timer for partikkelformige materialer og/eller presipitater.

Resultatene vist i tabell 1 indikerer at oppløseligheten til bendamustin er avhengig av temperatur og mengden av alkohol i de vandige løsningene. For de testede alkoholene økte oppløseligheten av bendamustin når konsentrasjonen av alkohol økte. Dannelsen av et presipitat var også avhengig av temperatur og tid. Bendamustin presipiterte ikke øyeblikkelig med noe alkohol, men krystalliserte etter lagring ved 5°C. Alkoholer varierte i deres effekt av oppløselighet. Uten å ønske å være bundet til noen spesiell teori har mindre alkoholer så som metanol og etanol en mindre effekt på oppløseligheten sammenlignet med større alkoholer (tertiær-butanol og n-butanol). Derimot er type alkohol også viktig. F.eks. ble n-propanol funnet å være bedre enn isopropanol for forebygging av presipitering i dette systemet. De to alkoholene med høyest effekt på oppløselighet var n-propanol og tertiær-butanol.

30

Tabell 1. Oppløselighet av bendamustin over en 24 timers periode i forskjellige alkoholer når lagret ved 5°C.

	Null tid	3 timer	6 timer	24 timer
<b>Metanol (volum/volum)</b>				
0 % (kun vann)	CCS	CCS	Presipitat	Presipitat
5 %	CCS	CCS	Presipitat	Presipitat
10 %	CCS	CCS	CCS	Presipitat
20 %	CCS	CCS	CCS	Presipitat
30 %	CCS	CCS	CCS	CCS
<b>Etanol (volum/volum)</b>				
1,9 %	CCS	CCS	Presipitat	Presipitat
5 %	CCS	CCS	Presipitat	Presipitat
10 %	CCS	CCS	CCS	Presipitat
20 %	CCS	CCS	CCS	CCS
30 %	CCS	CCS	CCS	CCS
<b>n-propanol (volum/volum)</b>				
5 %	CCS	CCS	CCS	Presipitat
10 %	CCS	CCS	CCS	CCS
20 %	CCS	CCS	CCS	CCS
30 %	CCS	CCS	CCS	CCS
<b>Isopropanol (volum/volum)</b>				
	CCS	Presipitat	Presipitat	Presipitat
5 %	CCS	CCS	CCS	CCS
10 %	CCS	CCS	CCS	CCS
20 %	CCS	CCS	CCS	CCS
30 %				
<b>n-butanol (volum/volum)</b>				
5 %	CCS	CCS	CCS	CCS
10 %	CCS	CCS	CCS	CCS
20 %	2 lag	2 lag	2 lag	2 lag
30 %	2 lag	2 lag	2 lag	2 lag
<b>Tert-butanol (volum/volum)</b>				
	CCS	CCS	CCS	Presipitat
5 %	CCS	CCS	CCS	Presipitat
10 %	CCS	CCS	CCS	CCS
20 %	CCS	CCS	CCS	CCS
30 %				

CCS står for klar fargeløs løsning

Eksperimenter for å kvantitativt bestemme oppløseligheten av bendamustin ved forskjellige temperaturer for tre forskjellige løsninger er oppsummert i fig. 1 og tabell 2. Mengden av TBA, 20 % (volum/volum) og 30 % (volum/volum), anvendt i

eksperimentet var basert på stabilitetsstudier (resultatene beskrevet nedenfor). For begge de testede løsningene ble oppløseligheten av bendamustin lineært redusert med temperaturer fra 25-0°C. Dette eksperimentet bekreftet dataene vist i tabell 1 og fremhever forskjellen i oppløseligheten til bendamustin for 20 % og 30 % TBA-løsninger.

Tabell 2. Oppløselighet av bendamustin i TBA

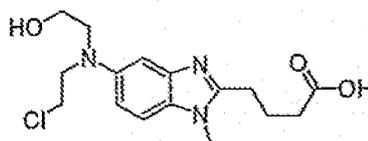
	-8°C	0°C	5°C	25°C
20 % (volum/volum) TBA 25,5 mg/ml mannitol Vann, q.s. til ønsket volum	14 mg/ml	11 mg/ml	17 mg/ml	47 mg/ml
30 % (volum/volum) TBA 25,5 mg/ml mannitol Vann, q.s. til ønsket volum	20 mg/ml	18 mg/ml	27 mg/ml	65 mg/ml

### C. Stabilitet

På grunn av dets instabilitet i vandige løsninger grunnet hydrolyse med vann krever bendamustin lyofilisering for å gjøre et produkt egnet for farmasøytisk anvendelse. I løpet av fremstilling av de lyofiliserte medikamentproduktene er vandige løsninger vanligvis nødvendig for fylling, før lyofilisering. Anvendelse av vandige løsninger i løpet av blandingen og fyllprosessen for bendamustin og andre nitrogensenneper kan følgelig resultere i nedbrytning av medikamentproduktet. Følgelig var effekten av forskjellige alkoholer på nedbrytning av bendamustin evaluert for å bestemme om det var mulig å finne formuleringer som ville muliggjøre for lengre fylltider, tilveiebringe lyofilisatpulver som kan bli hurtigere gjenopprettet enn den for tiden Ribomustin<sup>®</sup>-formuleringen, og/eller i lyofiliserte preparater av bendamustin med en bedre urenhetsprofil med hensyn på visse urenheter, f.eks. HP1 og BM1-dimer enn Ribomustin<sup>®</sup>.

Fortrinnsvis er et lyofilisert preparat stabilt med hensyn på HP1, dvs. mengden av HP1 øker ikke i betydelig grad (overskrider ikke spesifikasjoner for hylletid), for 6 måneder, mer foretrukket 12 måneder og enda mer foretrukket mer enn 24 måneder, f.eks. 36 måneder, når lagret ved omtrent 2°C til omtrent 30°C, fortrinnsvis 5°C.

Tabell 3 viser resultater av stabilitet for bendamustin i vann uten tilsetning av alkohol over en periode på 24 timer ved 5°C. Bendamustin nedbrytes hurtig i vann alene og danner hovedsakelig hydrolyseproduktet, HP1 (monohydroksybendamustin).



5

Monohydroksybendamustin (HP1)

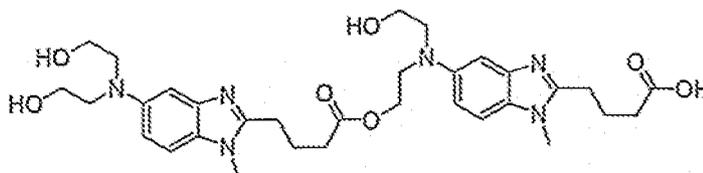
Formel II

Tabell 3. Stabilitet til bendamustin i vann

	Holdetid	Renhet (% areal)	HP1 (%)	Dimer (%)
0 % alkohol, dvs. vann alene	0 timer	99,11	0,60	0,11
	3 timer	98,83	0,86	0,13
	6 timer	98,44	1,22	0,17
	24 timer	95,67	3,81	0,29

10

Det andre hovednedbrytningsmiddel observert i løpet av denne studien og andre langtidsstabilitetsstudier var dimeren av bendamustin.

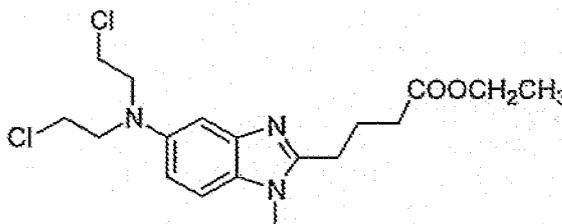


Bendamustindimer (BM1-dimer)

Formel III

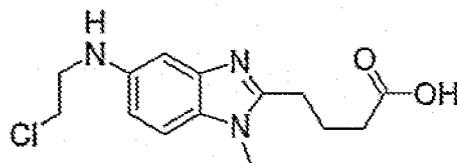
15

Andre nedbrytningsmidler innbefattet i Ribomustin-lyofilisert produkt er bendamustinetylester (BM1EE) (formel IV) og BM1DCE (formel V). BM1EE blir dannet når bendamustin reagerer med etylalkohol.



Bendamustinetylester (BM1EE)

Formel IV



BM1DCE

Formel V

5 Fig. 2 oppsummerer resultater av renheten i en HPLC-analyse etter  
 inkubering av bendamustin i forskjellige alkoholer i 24 timer ved 5°C. Resultatene  
 er presentert som areal% av det totale toppområdet. De numeriske verdiene for  
 fig. 2 er gitt i tabellene 3-9. Renheten var høyest i løsninger inneholdende høyere  
 konsentrasjoner av alkoholer, uansett alkohol. Av de evaluerte alkoholene ble  
 10 bendamustin nedbrutt minst i en løsning inneholdende omtrent 30 %  
 (volum/volum) TBA. I omtrent 10 % og omtrent 20 % alkoholløsninger var n-  
 butanol overlegen for unngåelse av nedbrytning av bendamustin. Ved 20 % og 30  
 % (volum/volum), resulterte n-butanol i vann i et bifasisk system grunnet den  
 manglende oppløseligheten av n-butanol i vann ved disse konsentrasjonene.

15 Fig. 3 og 4 viser mengden av nedbrytning av bendamustin som målt ved  
 HP1 og dimerdannelse kvantifisert med HPLC (som beskrevet heri). HP1 og  
 dimerdannelsen økte når mengden av alkoholkonsentrasjon ble redusert, uansett  
 alkohol. Denne økningen i urenheter oppstod med en antisipert tidsavhengighet  
 (se tabellene 3-9). Tert-butanol og n-butanol fremkom overlegne i forhold til andre  
 20 alkoholer for forebygging av nedbrytning av produkter. Som det fremgår i tabell 10  
 hadde mannitol ingen effekt på stabilisering av bendamustin med TBA.

25 Tabell 4. HPLC-stabilitetsresultater for stabiliteten av bendamustin i forskjellige  
 etylalkoholkonsentrasjoner over en periode på 24 timer. HP1 og dimer var  
 urenheter som økte i denne studien.

volum/volum alkohol	Holdetid	Renhet (% areal)	HP1 (%)	Dimer (%)
1,9 % etanol	0 timer	99,11	0,64	0,12
	3 timer	98,83	0,90	0,14
	6 timer	98,60	1,12	0,15
	24 timer	96,16	3,41	0,27

5 % etanol	0 timer	99,31	0,44	0,12
	3 timer	99,10	0,64	0,13
	6 timer	98,87	0,86	0,14
	24 timer	96,89	2,68	0,25
10 % etanol	0 timer	99,44	0,33	0,11
	3 timer	99,28	0,48	0,12
	6 timer	99,10	0,65	0,12
	24 timer	98,03	1,57	0,18
20 % etanol	0 timer	99,54	0,22	0,10
	3 timer	99,45	0,30	0,11
	6 timer	99,36	0,39	0,11
	24 timer	98,61	0,96	0,15
30 % etanol	0 timer	99,62	0,15	0,10
	3 timer	99,56	0,21	0,11
	6 timer	99,52	0,24	0,12
	24 timer	99,21	0,45	0,12

Tabell 5. HPLC-stabilitetsresultater for bendamustin i forskjellige tert-butanolkonsentrasjoner over en periode på 24 timer. HP1 og dimer var urenheter som økte i denne studien.

Konsentrasjon av alkohol (volum/volum)	Holdetid	Renhet (% areal)	HP1 (%)	Dimer (%)
5 % tert-butanol	0 timer	99,34	0,41	0,12
	3 timer	99,10	0,64	0,14
	6 timer	98,85	0,88	0,13
	24 timer	97,58	2,09	0,20
10 % tert-butanol	0 timer	99,46	0,30	0,11
	3 timer	99,26	0,48	0,12
	6 timer	99,05	0,69	0,13
	24 timer	98,04	1,64	0,19
20 % tert-butanol	0 timer	99,59	0,17	0,11
	3 timer	99,48	0,29	0,11
	6 timer	99,35	0,40	0,12
	24 timer	98,35	1,27	0,20
30 % tert-butanol	0 timer	99,63	0,13	0,10
	3 timer	99,60	0,16	0,10
	6 timer	99,58	0,18	0,11

	24 timer	99,42	0,34	0,12
--	----------	-------	------	------

Tabell 6. HPLC-stabilitetsresultater for forskjellige n-propylalkoholkonsentrasjoner over en periode på 24 timer. HP1 og dimer var urenheter som økte i denne studien.

Konsentrasjon av alkohol (volum/volum)	Holdetid	Renhet (% areal)	HP1 (%)	Dimer (%)
5 % n-propanol	0 timer	99,25	0,43	0,13
	3 timer	99,00	0,66	0,15
	6 timer	98,72	0,94	0,16
	24 timer	97,24	2,33	0,26
10 % n-propanol	0 timer	99,34	0,33	0,15
	3 timer	99,17	0,48	0,14
	6 timer	98,92	0,70	0,16
	24 timer	97,67	1,83	0,28
20 % n-propanol	0 timer	99,45	0,33	0,13
	3 timer	99,42	0,26	0,13
	6 timer	99,29	0,39	0,14
	24 timer	98,60	0,97	0,14 0,24
30 % n-propanol	0 timer	99,53	0,15	0,13
	3 timer	99,51	0,15	0,15
	6 timer	99,44	0,20	0,11
	24 timer	99,27	0,36	0,17

5

Tabell 7. HPLC-stabilitetsresultater for bendamustin i forskjellige isopropylalkoholkonsentrasjoner over en periode på 24 timer. HP1 og dimer var urenheter som økte i denne studien.

Konsentrasjon av alkohol (volum/volum)	Holdetid	Renhet (% areal)	HP1 (%)	Dimer (%)
5 % isopropanol	0 timer	99,21	0,48	0,13
	3 timer	98,65	0,72	0,14
	6 timer	98,56	1,02	0,14
	24 timer	96,14	3,35	0,26
10 % isopropanol	0 timer	99,32	0,37	0,12

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

Tabell 8. HPLC-stabilitetsresultater for bendamustin i forskjellige metylalkoholkonsentrasjoner over en periode på 24 timer. HP1 og dimer var urenheter som økte i denne studien.

5

Konsentrasjon av alkohol (volum/volum)	Holdetid	Renhet (% areal)	HP1 (%)	Dimer (%)
5 % metanol	0 timer	99,35	0,40	0,12
	3 timer	98,97	0,70	0,14
	6 timer	98,66	0,95	0,14
	24 timer	96,65	2,83	0,23
10 % metanol	0 timer	99,42	0,34	0,11
	3 timer	99,01	0,59	0,12
	6 timer	98,86	0,80	0,12
	24 timer	97,65	1,85	0,18
20 % metanol	0 timer	99,56	0,22	0,11
	3 timer	99,31	0,38	0,11
	6 timer	98,99	0,50	0,12
	24 timer	98,31	1,15	0,16
30 % metanol	0 timer	99,59		
	3 timer			
	6 timer			
	24 timer			

Tabell 9. HPLC-stabilitetsresultater for bendamustin i forskjellige n-butylalkoholkonsentrasjoner over en periode på 24 timer. HP1 og dimer var urenheter som økte i denne studien.

Konsentrasjon av alkohol (volum/volum)	Holdetid	Renhet (% areal)	HP1 (%)	Dimer (%)
5 % butanol	0 timer	99,25	0,49	0,13
	3 timer	98,94	0,73	0,14
	6 timer	98,76	0,91	0,14
	24 timer	97,46	2,20	0,21
10 % butanol	0 timer	99,44	0,30	0,11
	3 timer	99,18	0,49	0,12
	6 timer	99,03	0,64	0,12
	24 timer	98,13	1,55	0,17
20 % butanol <sup>a</sup>	0 timer	99,54	0,23	0,10
	3 timer	99,45	0,31	0,11
	6 timer	99,30	0,40	0,11
	24 timer	98,81	0,91	0,14
30 % butanol <sup>a</sup>	0 timer	99,55	0,243	0,10
	3 timer	99,40	0,29	0,10
	6 timer	99,40	0,37	0,11
	24 timer	99,00	0,74	0,12

<sup>a</sup> - begge løsningene hadde to lag/faser av væsker i beholderen. Løsningene ble vorteksbehandlet før preparering av prøve.

Resultatene i tabellene 1-9 indikerer at stabiliteten av bendamustin HCl med hensyn til HP1 og dimer økes med økende alkoholkonsentrasjon.

Tabell 10. HPLC-stabilitetsresultater for bendamustin i TBA med og uten mannitol over en periode på 24 timer.

Prøve	Renhet (% areal)	HP1 (%)
TBA 20 % (volum/volum) med mannitol	99,59	0,17
0 timer	99,35	1,27
24 timer @ 5°C		
TBA 20 % (volum/volum) uten mannitol	100,0	0,00

0 timer	98,80	1,21
24 timer @ 5°C		

Bemerkning: Prøver analysert uten mannitol ble analysert ved HPLC ved anvendelse av en normal fase metode, mens prøvene analysert med mannitol anvendte en revers fase HPLC-metode. En viss variabilitet kan fremkomme i andre prøver analysert mellom de to metodene.

5

#### D. Lyofiliseringscyklusutvikling

Forskjellige prelyofiliseringsformuleringer ble dannet ved forskjellige konsentrasjoner av bendamustin, mannitol og alkoholer i vann. Syklusutviklingen ble forandret og optimalisert ved hvert trinn for frysing (hurtig vs. sakte), primær tørking (både temperatur og trykk), og sekundær tørking som beskrevet heri.

10

Basert på all informasjon beskrevet ovenfor angående oppløselighet, stabilitet og letthet ved lyofilisering er følgende formuleringer angitt:

Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin	omtrent 2-40 mg/ml
Mannitol	omtrent 0-50 mg/ml
Alkohol	omtrent 0,5-40 % (v/v)
Vann, q.s. til	ønsket volum

hvor alkoholen er valgt fra metanol, n-propanol eller isopropanol

Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin	omtrent 5-20 mg/ml
Mannitol	10-30 mg/ml
Alkohol	1-20 % (v/v)
Vann, q.s. til	ønsket volum

hvor alkoholen er valgt fra metanol, n-propanol eller isopropanol

Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin	omtrent 5-20 mg/ml
Mannitol	10-30 mg/ml
Alkohol	5-40 % (volum/volum)
Vann, q.s. til	ønsket volum

Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 12-17 mg/ml
Mannitol	omtrent 20-30 mg/ml
Alkohol	omtrent 5-15 % (v/v)
Vann, q.s. til	ønsket volum
Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 15 mg/ml
Mannitol	omtrent 25,5 mg/ml
Alkohol	omtrent 10 % (v/v)
Vann, q.s. til	ønsket volum
Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 2-40 mg/ml
Mannitol	omtrent 0-50 mg/ml
Butanol	omtrent 0,5-20 % (v/v)
Vann, q.s. til	ønsket volum
Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 5-20 mg/ml
Mannitol	omtrent 10-30 mg/ml
Butanol	omtrent 1-10 % (volum/volum)
Vann, q.s. til	ønsket volum
Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 12-17 mg/ml
Mannitol	omtrent 20-30 mg/ml
Butanol	omtrent 1-10 % (volum/volum)
Vann, q.s. til	ønsket volum
Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 15 mg/ml

Mannitol	omtrent 25,5 mg/ml
Butanol	omtrent 10 % (volum/volum)
Vann, q.s. til	ønsket volum
Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 2-50 mg/ml
Mannitol	omtrent 0-50 mg/ml
Tertiær butanol	omtrent 0,5-100 % (volum/volum)
Vann, q.s. til	ønsket volum
Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 2-50 mg/ml
Mannitol	omtrent 0-50 mg/ml
Tertiær butanol	omtrent 0,5-99,9 % (volum/volum)
Vann, q.s. til	ønsket volum
Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 2-50 mg/ml
Mannitol	omtrent 0-50 mg/ml
Tertiær butanol	omtrent 0,5-99 % (volum/volum)
Vann, q.s. til	ønsket volum
Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 2-50 mg/ml
Mannitol	omtrent 0-50 mg/ml
Tertiær butanol	omtrent 90-99 % (volum/volum)
Vann, q.s. til	ønsket volum
Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 2-20 mg/ml
Mannitol	omtrent 10-30 mg/ml
Tertiær butanol	omtrent 5-80 % (volum/volum)
Vann, q.s. til	ønsket volum

Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 12-17 mg/ml
Mannitol	omtrent 20-30 mg/ml
Tertiær butanol	omtrent 10-50 % (volum/volum)
Vann, q.s. til	ønsket volum

Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 12,5-15 mg/ml
Mannitol	omtrent 0-30 mg/ml
Etanol	omtrent 20-30 % (volum/volum)
Vann, q.s. til	ønsket volum

Ingrediens	Konsentrasjon
Bendamustin HCl	omtrent 15 mg/ml
Mannitol	omtrent 25,5 mg/ml
Tertiær butanol	omtrent 30 % (volum/volum)
Vann, q.s. til	ønsket volum

## EKSEMPLER

De følgende eksempler er gitt for å illustrere visse aspekter av foreliggende oppfinnelse og å hjelpe fagfolk innenfor dette området til å utføre oppfinnelsen. Disse eksemplene er på ingen måte betraktet å begrense omfanget av oppfinnelsen på noen måte.

### Materialer:

Bendamustin HCl, (Degussa, Lot # 0206005 og 0206007)

Mannitol, NF eller ekvivalent (Mallinckrodt)

10 Etylalkoholdehydrat (200 proof), USP eller ekvivalent (Spectrum)

Tertiær-butylalkohol, ACS (EM Scinece)

Metanol (Spectrum og EMD)

Propanol (Spectrum)

Isopropanol (Spectrum)

Butanol (Spectrum)

Vann, HPLC-kvalitet eller ekvivalent (EMD)

Acetonitril, HPLC-kvalitet eller ekvivalent (EMD)

Trifluoreddiksyre, J.T. Baker

5 Metanol, HPLC-kvalitet eller ekvivalent (EM Science, kat. # MX0488P-1)

Trifluoreddiksyre, HPLC-kvalitet eller ekvivalent (JT Baker, kat. # JT470-01)

#### Utstyr:

Waters 2695 Alliance HPLC-system med fotodioderekkedetektor

10 Waters 2795 Alliance HPLC-system med dobbel bølgelengdedetektor

Analytisk balanse (Mettler AG285, ID # 1028) og (Mettler XS205)

VirTis Lyophilizer AdVantage

Agilent Zorbax SB-C18,5  $\mu\text{m}$  80 Å 4,6 x 250 mm kolonne, kat. # 880975-902

15 Eksempel 1 - HPLC-prosedyrer

#### *Metode 1*

Mobil fase A:	0,1 % TFA; H <sub>2</sub> O
Mobil fase B:	0,1 % TFA; 50 % ACN:50 % H <sub>2</sub> O
UV:	230 nm
Strømningsrate:	1,0 ml/min.
Kolonne temp.:	30°C
Kolonne:	Zorbax SB-C18,5 $\mu\text{m}$ 80 Å 4,6x250 mm
Prøvetemp.:	5°C
Injeksjonsvolum:	10 $\mu\text{l}$
Prøvekonsentrasjon:	0,25 mg/ml i MeOH
Gradient:	20 % B i 1 min. 20-90 % B i 23 min. 90 % B i 6 min. tilbake til 20 % B i 1 min. holdt ved 20 % B i 4 min.
Kjøretid:	30 min.

42

Etter kjøretid: 5 min.

### Metode 2

Mobil fase A: 0,1 % TFA; H<sub>2</sub>O:ACN (9:1)  
 Mobil fase B: 0,1 % TFA; H<sub>2</sub>O:ACN (5:5)  
 UV: 230 nm  
 Strømningsrate: 1,0 ml/min.

Kolonne: Zorbax SB-C18,5 µm 80 Å 4,6x250 mm  
 Kolonnetemp.: 30°C  
 Prøvetemp.: 5°C  
 Injeksjonsvolum: 10 µl  
 Prøvekonsentrasjon: 0,25 mg/ml i MeOH  
 Gradient: 0 % B i 3 min.  
 50-70 % B i 17 min.  
 70-90 % B i 2 min.  
 90 % B i 5 min.  
 tilbake til 0 % B i 1 min.  
 holdt ved 0 % B i 4 min.

Kjøretid: 40 min.  
 Etter kjøretid: 5 min.

### 5 Metode 3

Fase A: HPLC-kvalitet vann med 0,1 % TFA (volum/volum)  
 Fase B: HPLC-kvalitet ACN/vann (1:1 volum/volum) med 0,1 %  
 TFA (volum/volum)  
 UV: 254 nm  
 Strømningsrate: 1,0 ml/min.  
 Kolonne: Zorbax SB-C18,5 µm 80 Å 4,6x250 mm  
 Kolonnetemp.: 30°C

Prøvetemp.: 5°C  
 Injeksjonsvolum: 5 µl  
 Ervervelsestid: 30 min.  
 Ettetid: 9 min.  
 Fortynningsmiddel: metanol

Gradient:

Tid (min.)	% Fase A	% Fase B
0,0	82	18
7,0	60	40
11,0	60	40
15,0	20	80
30,0	20	80
31,0	82	18

Preparering av prøve, oppløs medikamentproduktet med 200 ml MeOH.

- 5 Soniker i 6 min. Løsningen kan bli injisert direkte i HPLC (ca. 0,5 mg/ml).

#### Metode 4

Fase A: HPLC-kvalitet vann med 0,1 % TFA (volum/volum)  
 Fase B: HPLC-kvalitet ACN med med 0,1 % TFA (volum/volum)  
 UV: 254 nm  
 Strømningsrate: 1,0 ml/min.  
 Kolonne: Zorbax SB-C18,5 µm 80 Å 4,6x250 mm  
 Kolonnetemp.: 30°C  
 Prøvetemp.: 5°C  
 Injeksjonsvolum: 2 µl  
 Ervervelsestid: 31 min.  
 Ettetid: 5 min.  
 Fortynningsmiddel: NMP/0,1 % TFA i vann (50:50 volum/volum)

Gradient:

Tid (min.)	% Fase A	% Fase B
0,0	93	7
5	93	7
13	73	27
16	73	27
25	10	90
31	10	90

Preparering av prøve i metode 4, oppløs medikamentproduktet med en kjent mengde fortynningsmiddel for å danne en konsentrasjon på 4,2 mg/ml for injeksjon direkte i HPLC. Det kan være nødvendig å utføre en andre fortynning (100 mg/holder doseringsform) for å oppnå en 4,2 mg/ml prøvekonsentrasjon.

### Resultater

Retensjonstider for noen urenheter av bendamustin ved anvendelse av HPLC metode 1 beskrevet ovenfor er vist i tabell 11. En HPLC-kromatograf for Ribomustin<sup>®</sup> med anvendelse av HPLC-prosedyren beskrevet heri er vist i fig. 6.

Tabell 11. Retensjonstid for bendamustin og noen av dets urenheter ved anvendelse av HPLC metode 1

Prøvenavn	Retensjonstid (min.)
HP1	14,110
Bendamustin	22,182
BM1-dimer	24,824
BM1EE	26,968

Til tross for at HPLC metode 1 hadde evne til å oppløse urenheter tilstede i bendamustin hadde det ikke evne til å separere en potensiell urenheter dannet i løpet av analysen, metylesteren av bendamustin (BM1ME). Forskjeller i retensjonstid mellom BM1ME og BM1-dimer var kun 0,3 min. For å oppløse BM1-dimeren ble en annen HPLC-metode (nr. 2) utviklet. HPLC-metode nr. 2 hadde evne til å separere alle urenheter, men krevde en lengre kjøretid på 45 min. (tabell 12).

Tabell 12: Retensjonstid for bendamustin og urenheter ved anvendelse av HPLC metode 2.

Prøvenavn	Retensjonstid (min.)
HP1	15,694
BM1	25,420
BM1ME	31,065
BM1-dimer	32,467
BM1EE	36,038

- 5 Urenhetsprofilen til forskjellige batcher av Ribomustin ved anvendelse av HPLC metode 3 er vist i tabell 13.

Tabell 13 - Profil av urenheten til Ribomustin ved anvendelse av HPLC metode 3

% areal					
Batch	Bendamustin (HCl)	HP1	BM1EE	BM1-dimer	BM1DCE
03H08	98,14	1,07	0,21	0,34	0,03
03H07	97,67	1,5	0,2	0,33	0,04
02K27	96,93	0,93	0,29	1,18	0,08
03C08	97,61	1,24	0,19	0,46	0,02

10 Eksempel 2 - Oppløselighet

Oppløseligheten av bendamustin HCl (bendamustin) i vann (alene) og med varierende mengder av metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol og tertiær-butylalkohol (TBA) ble bestemt ved visuell inspeksjon. Mengden av bendamustin med 15 mg/ml, mannitol med 25,5 mg/ml ble dannet i 10 ml av de indikerte alkoholløsningene (tabell 1) ved romtemperatur. Prøvene ble deretter avkjølt ved 15 5°C og spesielt etter 0, 3, 6 og 24 timer for partikler og/eller presipitater.

Resultatene som er oppsummert i tabell 1 indikerer at oppløseligheten av bendamustin er avhengig av temperatur og mengden av alkohol i de vandige løsningene. For alle alkoholene økte oppløseligheten av bendamustin når 20 konsentrasjonen av alkohol økte. Dannelsen av et presipitat var kun avhengig av temperatur og tid.

Oppløseligheten av bendamustin ble også bestemt i 20 % (volum/volum) TBA inneholdende 25,5 mg/ml mannitol i vann, og 30 % (volum/volum) TGBA inneholdende 25,5 mg/ml mannitol i vann (fig. 1). Bendamustin ble tilsatt til 4 ml av hver løsning med blanding helt til det ikke lenger var mulig å bli oppløst. De mettede løsningene ble blandet i 1 time ved -8°C, 0°C, 5°C eller 25°C. Prøvene ble deretter sentrifugert og plassert tilbake til opprinnelig temperatur i minst 30 min. - 8°C prøven ble plassert i et isbad inneholdende natriumklorid som reduserer temperaturen til isbadet, og temperaturen ble målt når prøven ble trukket for analyse. En aliquot av hver prøve ble tatt og dannet for HPLC-analyse.

Resultatene av disse eksperimentene er vist i fig. 1 og tabell 2. Mengden av TBA, 20 % (volum/volum) og 30 % (volum/volum), anvendt i eksperimentet (fig. 1) var basert på stabilitetsstudiene beskrevet heri.

Som indikert i fig. 1 ble stabiliteten av bendamustin redusert lineært med temperaturen (25°C til 0°C). Oppløseligheten av bendamustin var temperaturavhengig uansett om det ble oppløst i vann alene eller med en alkohol. 20 % volum/volum TBA var sannsynligvis den nedre grensen nødvendig for tilstrekkelig og robust farmasøytisk fremstilling grunnet stabiliteten av oppløseligheten av bendamustin. En fylløsning av 15 mg/ml bendamustin er nær opptil metningsgrensen på 17,2 mg/ml bendamustin ved 5°C, men høyere enn grensen på 0°C. 30 % (volum/volum) TBA er en anbefalt konsentrasjon av TBA for den endelige formuleringen og er godt innenfor oppløselighetsgrensen uansett temperatur.

### Eksempel 3 - stabilitet

#### A. Stabilitet i vann

Løsninger av bendamustin (15 mg/ml) og mannitol (25,5 mg/ml) ble dannet i vann ved romtemperatur og øyeblikkelig plassert i et isbad (for å redusere temperaturen hurtig til omtrent 5°C) i 10 min. og deretter avkjølt ved 5°C. En prøve av hver formulering ble analysert ved HPLC ved anvendelse av metodene beskrevet heri etter 0, 3, 6 og 24 timer når lagret ved 5°C.

#### B. Stabilitet i alkoholer

Løsninger inneholdende 15 mg/ml bendamustin, 25,5 mg/ml mannitol og 1,9 %, 5 %, 10 %, 20 % eller 30 % (volum/volum) etylalkohol i vann eller 5 %, 10 %, 20 % eller 30 % (volum/volum) TBA, metanol, propanol, isopropanol eller butanol i vann ble dannet ved romtemperatur, plassert i et isbad i 10 min. og deretter avkjølt ved 5°C. En prøve av hver formulering ble analysert ved HPLC etter 0, 3, 6 og 24 timer når lagret ved 5°C.

### C. Resultater av stabilitet

Tabell 3 viser resultater av stabilitet av bendamustin i vann uten tilsetning av alkohol over en periode på 24 timer ved 5°C. Bendamustin nedbrytes hurtig i vann, men stabiliteten av bendamustin øker med økende konsentrasjoner av alkohol (fig. 2, 3 og 4). Til tross for at alkoholer ofte blir anvendt ved lyofilisering for å behjelpe oppløselighetsproblemer, er effekten av alkoholer på stabiliteten av bendamustin unik, uventet og nyttig for fremstilling av bendamustin med færre urenheter på grunn av at en vandig løsning kan bli anvendt mens stabiliteten av bendamustin opprettholdes. TBA ble funnet å være den beste stabilisatoren av de seks testede alkoholene (fig. 2, 3 og 4). Alle alkoholer ved 30 % (volum/volum) reduserte dannelsen av urenheten HP1 og dimer ved 5°C i opptil 24 timer. Med hensyn til TBA nådde kun HP1 omtrent 0,4 % når lagret ved 5°C i opptil 24 timer. Lavere konsentrasjoner av alkohol trenger ikke å være effektivt, når formulert ved 15 mg/ml bendamustin og lagret ved 5°C grunnet presipitering av bendamustin og dannelse av urenheter.

### Eksempel 4 - Optimalisering av formuleringen

Etter at oppløselighet og stabilitet til bendamustin ble bestemt ble formuleringen optimalisert for lyofilisering. På grunn av at konsentrasjonen av bendamustin er høyere i en 30 % TBA vannmettet løsning sammenlignet med andre alkoholløsninger er det betraktet at størrelsen på beholderen som er nødvendig for å fylle 100 mg bendamustin kan bli redusert fra den for tiden Ribomustin®-presentasjonen. Til tross for at en mettet løsning av bendamustin inneholder 18 mg/ml ved 0°C ble en konsentrasjon på 15 mg/ml valgt for formulering for å kompensere for visse forskjeller i API-oppløselighet grunnet forskjeller i bulk API-renhet som et resultat av batchforskjeller. En konsentrasjon

på 15 mg/ml bendamustin krever 6,67 ml for å fylle 100 mg av bendamustin HCL pr. beholder.

5 Overflateareal (sublimasjon) til volum forholdet er kritisk for å produsere et lyofilisert produkt med bra utseende som frysetørres hurtig. Generelt okkuperer de lyofiliserte produktene mellom 30-50 % av beholdervolumet. En 20 ml beholder med 6,67 ml inneholder omtrent 30 % av dets kapasitet og har et overflatearealforhold på 0,796 cm<sup>2</sup>/ml.

Mannitol ble valgt som bulkmiddel for å opprettholde en formulering lik Ribomustin®. Studier ble utført for å evaluere effekten av mannitol på bendamustinoppløselighet og utseende av produktet. Mannitol reduserer oppløseligheten av bendamustin (ved 15 mg/ml) i både etanol og TBA vandige løsninger. F.eks. presipiterte ikke løsninger inneholdende 5 % og 10 % etanol og TBA uten mannitol over 24 timer. Derimot for prøver med mannitol (tabell 1) ble presipitat observert i løpet av 24 timer. Det var ikke noe presipitat med vandige løsninger inneholdende 30 % (volum/volum) TBA, 15 mg/ml bendamustin og 25,5 mg/ml mannitol. For å opprettholde en velformet kake motstandsdyktig mot brudd i løpet av håndtering var et minimum på 134 mg/beholder av mannitol nødvendig og uten forskjeller observert i beholdere med opptil 200 mg/beholder av mannitol.

Alle testede alkoholer økte stabiliteten og oppløseligheten av bendamustin. Derimot var en signifikant målfraksjon nødvendig for å påvirke stabiliteten av fylløsningen og lette fremstillingen. Mindre alkoholer har den uønskede effekten av å redusere frysepunktet til bulkløsningen og som følgelig krever lengre lyofiliseringssykluser ved lavere temperaturer. Høyere konsentrasjoner av mannitol og etanol produserte ikke attraktive kaker som det var vanskelig å gjenopprette. 10 % etanol, 20 % etanol, 10 % isopropanol, 20 % isopropanol eller 30 % TBA vandige løsninger inneholdende bendamustin (15 mg/ml), mannitol (25,5 mg/ml) ble dannet og lyofilisert. De lyofiliserte beholderne fylt fra løsninger bestående av 10 % etanol, 20 % etanol, 10 % isopropanol, 20 % isopropanol dannet enten en kollapset kake eller en filmrest. Det eneste løsningsmiddelsystemet som produserte en akseptabel kake var 30 % TBA. I tillegg var det vanskelig å gjenopprette 10 % etanol, 20 % etanol, 10 % isopropanol, 20 % isopropanol lyofiliserte beholdere og oppløste ikke fullstendig før >45 min.

Evnen til å anvende en mindre beholder ble begrenset av konsentrasjonen eller oppløseligheten av bendamustin i den vandige/organiske løsningen. Ved lavere konsentrasjoner av etanol, metanol, isopropanol og n-propanol, som produserte akseptabelt utseende av kaken er en mer fortynnet løsning av bendamustin nødvendig grunnet begrensninger ved oppløseligheten. For å opprettholde en presentasjon med 100 mg bendamustin pr. beholder vil en beholder som er større enn 50 ml være nødvendig. Videre indikerer studier av stabilitet heri at ved lavere konsentrasjoner av alkohol var den kjemiske stabiliteten ikke tilstrekkelig for å muliggjøre akseptable fylttider.

En av faktorene som påvirker letthet ved rekonstitusjon er porøsiteten av lyofilisatet. Generelt er amorft presipiterte faststoffer med lite overflateareal mer vanskelig å oppløse. De fleste lyofilisatene inneholdende mannitol vil bli gjenopprettet i løpet av 3-5 min. dersom det ikke blir dannet noe presipitat i løpet av lyofiliseringen, ofte forårsaket av avdampning av et væske ("melt back"). Basert på vår erfaring med flere lyofiliseringsløsningsmiddelsystemer og uten å ønske å være bundet til noen spesiell teori kan problemene assosiert med rekondisjonering av ribomustin være assosiert med presipitering forårsaket av tilbakesmelting i løpet av lyofilisering. De fleste organiske løsningsmidlene blir ikke lyofilisert effektivt og forårsaker tilbakesmelting ("melt back") på grunn av deres lave smeltepunkt. TBA (tertiær butylalkohol) har et høyere smeltepunkt og et lignende damptrykk sammenlignet med vann. TBA blir fjernet ved sublimasjon, ikke-avdampning, ved omtrent samme rate som vann. Lyofilisater produsert med 30 % (volum/volum) TBA ifølge oppfinnelsen gjenoprettes i løpet av 3-10 min. sammenlignet med kommersielt tilgjengelig Ribomustin som tar 30-45 min.

Basert på oppløselighet, stabilitet, letthet ved rekondisjonering og betraktninger ved fremstilling er følgende en foretrukket pre-lyofiliseringsformulering ifølge foreliggende oppfinnelse: bendamustin HCl omtrent 15 mg/ml, mannitol omtrent 25,5 mg/ml, omtrent 30 % (volum/volum) tertier butylalkohol og q.s. for anvendelse av vann for injeksjon. Formuleringen blir deretter fylt ved 5°C ved anvendelse av 6,67 ml i en brun 20 ml, 20 mm beholder og delvis stoppet med en brombutylstopper og applisert i en på forhånd avkjølt lyofilisator.

### Eksempel 5 - vurdering av urenheter

Vesentlige urenheter innført i løpet av fremstilling av Ribomustin<sup>®</sup>, samblending, fylling og lyofiliseringsprosedyre, som bestemt ved HPLC-analyse (fig. 6) er hydrolyseproduktet HP1, dimer og etylester av bendamustin, BM1EE. BM1EE kan bli dannet i løpet av fremstilling av medikamentsubstansen, f.eks. i løpet av omkrystallisering og/eller rensingsprosessene. BM1EE er kjent for å være et mer potent cytotoxisk medikament enn bendamustin. Eksperimenter ble utført for å bestemme om anvendelse av en 30 % TBA vandig fylløsning vil føre til dannelsen av bendamustin t-butylester.

Eksperimenter ble utført ved anvendelse av tradisjonelle betingelser for Fisher forestringsreaksjon nødvendig for dannelsen av t-butylester av bendamustin. Bendamustin ble oppvarmet i 60°C TBA med HCl i 20 timer. Ingen reaksjon ble observert. Dette resultatet indikerer at det vil være meget vanskelig å danne tert-butylester av bendamustin i løpet av fyll/ferdigprosessen. Ingen nye urenheter i fremstillingen av medikamentproduktet fra TBA er blitt observert i studier for stabilitet frem til nå.

For å behjelpe testing av medikamentproduktet ved synteseveier ved anvendelse av mer reaktive kilder for t-butylgruppen utviklet. Et annet forsøk på å danne tert-butylesteren ble utført ved dannelsen av acylkloridet av bendamustin. Ved suspensjon av bendamustin i metylenklorid ble behandlet med oksalyklorid og N,N-dimetylformamid. Etter at acylklorid var blitt dannet ble løsningsmidlet konsentrert. Resten ble tilsatt til metylenklorid, tert-butanol, trietylamin og 4-dimetylaminopyridin og blandingen ble omrørt ved romtemperatur over natt. Etter tilsetning av alle løsningsmidler og rensing ble en ukjent forbindelse tilveiebrakt. LC-MS matchet ikke molekylvekten til bendamustin tert-butylesteren og proton NMR viste ikke toppen for tert-butyl. Dette forsøket produserte heller ikke bendamustin tert-butylesteren. Anvendelse av TBA som ko-løsningsmiddel har følgelig en ytterligere fordel som omfatter manglende dannelse av esteren fra alkoholen.

### Eksempel 6 - utvikling av lyofiliseringssyklus

En mengde lyofiliseringssykluser ble utført for å vurdere de kritiske stadiene for lyofilisering og oppnåelse av den mest effektive tørkesyklusen. Eksperimenter

ble utført for å vurdere effekten av fryserate, primær tørketemperatur, tid og trykket til produktet.

#### A. Fryserate

5 Litteraturen rapporterer at TBA oppnår forskjellige krystallformer avhengig av fryserate. I noen TBA-løsninger, desto saktere produktet fryser, desto hurtigere blir det tørket. Store krystaller dannes i løpet av den sakte frysingen produserer større porer som muliggjør mer effektiv sublimasjon. I løpet av studiene med bendamustin ble derimot fryseraten ikke funnet å være en kritisk  
10 prosesseringsparameter når vurdert ved 2 og 8 timer.

#### B. Primær og sekundær tørking

I løpet av de første forsøkene på å lyofilisere fra 30 % TBA-løsninger ble lyofilisert kakebrudd og pulver tatt ut av beholderen. Disse kakene så ut til å  
15 inneholde amorfe partikler innenfor lyofilisatet som indikerer tilbakesmelting. Dette fenomenet var reproducerbart og oppstod når produktet nådde omtrent  $-10^{\circ}\text{C}$  (det refereres til fig. 5) uavhengig av varmeraten. Flere variabler ble testet for å bestemme årsaken og løsningen på problemet med pulverejsering. Trykket ble øket fra  $50\ \mu\text{m}$  til  $150\ \mu\text{m}$  i løpet av den primære tørkingen, men pulverejseringen  
20 ble fortsatt observert, men dog i mindre grad. Dette eksperimentet ble deretter gjentatt med unntagelse av at fryseraten ble utvidet til 8 timer fra 2 timer. Denne forandringen hadde ingen effekt.

Lengden på den primære tørkingen ble deretter evaluert. F.eks. ble følgende meget sakte tørkesyklus vurdert: frysing fra  $+25^{\circ}\text{C}$  til  $-50^{\circ}\text{C}$  i 8 timer;  
25 holding ved  $-50^{\circ}\text{C}$  i 5 timer, oppvarming og tørking fra  $-50^{\circ}\text{C}$  til  $-25^{\circ}\text{C}$  i syv timer; holding i 20 timer ved  $-25^{\circ}\text{C}$ , oppvarming og tørking fra  $-25^{\circ}\text{C}$  til  $-15^{\circ}\text{C}$  i 2 timer og holding i 20 timer ved  $-15^{\circ}\text{C}$ , oppvarming og tørking fra  $-15^{\circ}\text{C}$  til  $40^{\circ}\text{C}$  i 6 timer og holding i 20 timer ved  $40^{\circ}\text{C}$  mens trykket i kammeret ble opprettholdt ved  $150\ \mu\text{m}$  i løpet av tørkingen. Ingen pulverejeksjon (fig. 5) ble observert. Denne syklusen  
30 resulterte i en velformet kake uten brudd som lett ble gjenopprettet. Uten å ønske å være bundet til noen spesiell teori kan problemene med pulverejsering og vanskeligheter med rekonstitusjon være resultatet av tørking av lyofilisatet for hurtig og som dermed resulterer i sterk dampstrømning ut av kaken i tillegg til

tilbakesmelting. Med anvendelse av en mindre aggressiv tørkesyklus ble en estetisk, stabil og lett rekondisjonerbar kake reproduserbart dannet. Følgelig kan det å fjerne alt ubundet vann og tertiær-butylalkohol før den sekundære tørkingen forebygge tilbakesmelting og også ejisering av pulver. Syklusen for lyofilisering ble ytterligere optimalisert under disse forsiktige betingelsene (fig. 5). Det var ingen øyeblikkelige nedbrytningsprodukter som et resultat av tørking ved 40°C i opptil 20 timer.

#### Eksempel 7 - Lyofiliseringssyklus

Trinn	Beskrivelse	Tid (timer)	Temperatur (°C)	Trykk (mikron)
1	Hold	0,25	5°C	-
2	Øk ("ramp")	8	-50°C	-
3	Hold	4	-50°C	-
4	Øk	3	-20°C	150
5	Hold	6	-20°C	150
6	Øk	1	-15°C	150
7	Hold	20	-15°C	150
8	Øk	0,5	-12°C	150
9	Hold	15,5	-12°C	150
10	Øk	15	35°C	50
11	Hold	10	35°C	50
12	Øk	1	40°C	50
	Hold	5	40°C	50
Totalt		89,25	-	-

10

Alle sammensetninger og metoder som er beskrevet og krevd heri kan bli dannet og utført uten unødig eksperimentering i lys av foreliggende beskrivelse.

Alle patenter, patentsøknader og publikasjoner nevnt i beskrivelsen indikerer nivået til fagfolk innenfor dette området hvortil oppfinnelsen er rettet mot.

15

Oppfinnelsen som illustrativt er beskrevet heri kan på egnet måte bli praktisert i fravær av eventuelle elementer som ikke spesifikt er beskrevet heri. Følgelig i hvert tilfelle heri vil f.eks. hvilke som helst av betegnelsene "omfatte", "bestående vesentlig av" og "innbefatte" bli erstattet med hvilke som helst av de andre to betegnelsene. Betegnelsene og uttrykkene som er blitt utviklet blir anvendt som betegnelser for beskrivelsen og ikke som en begrensning, og det er ikke hensikten at anvendelsen av slike uttrykk og betegnelser skal ekskludere

20

eventuelle ekvivalenter av trekkene som er vist og beskrevet eller deler derav, men det er å bemerke at forskjellige modifikasjoner er mulige innenfor rammen av de vedlagte patentkravene.

## P A T E N T K R A V

1. Farmasøytisk sammensetning, karakterisert v e d at den omfatter bendamustin eller bendamustin-hydroklorid, mannitol, tertiær butylalkohol og vann, hvor nevnte bendamustin eller bendamustinhydroklorid er tilstede i en konsentrasjon på 12-17 mg/ml, nevnte mannitol er tilstede i en konsentrasjon på 20-30 mg/ml, og nevnte tertiære butylalkohol er tilstede i en konsentrasjon på 20-30% (volum/volum).
2. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 2, karakterisert v e d at nevnte bendamustin eller bendamustinhydroklorid er tilstede i en konsentrasjon på 15 mg/ml, nevnte mannitol er tilstede i en konsentrasjon på 25,5 mg/ml og nevnte tertiære butylalkohol er tilstede i en konsentrasjon på 30% (volum/volum).
3. Fremgangsmåte for fremstilling av en lyofilisert farmasøytisk sammensetning ved lyofilisering av den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 1, karakterisert v e d at lyofiliseringen omfatter
  - i) frysing av den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 1 til en temperatur under - 40 °C for å danne en frosset oppløsning;
  - ii) holding av den frosne oppløsningen ved en temperatur som er ved eller under - 40 °C i minst 2 timer;
  - iii) økning av temperaturen i den frosne oppløsningen til en primær tørketemperatur på mellom - 40 °C og - 10 °C for å danne en tørket oppløsning;
  - iv) holding av oppløsningen ved den primære tørketemperaturen i 10 til 70 timer;
  - v) økning av temperaturen i den tørkede oppløsningen til en sekundær tørketemperatur på mellom 25 °C og 40 °C; og
  - vi) holding av oppløsningen ved den sekundære tørketemperaturen i 5 til 40 timer for å danne den lyofiliserte farmasøytiske sammensetningen.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvor bendamustin eller bendamustinhydroklorid er tilstede i nevnte farmasøytiske sammensetning ved en konsentrasjon på 12-17 mg/ml, nevnte mannitol er tilstede i nevnte farmasøytiske sammensetning ved en konsentrasjon på 20-30 mg/ml og nevnte tertiære

butylalkohol er tilstede i nevnte farmasøytiske sammensetning ved en konsentrasjon på 20-30% (volum/volum).

5. Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvor bendamustin eller  
5 bendamustinhydroklorid er tilstede i nevnte farmasøytiske sammensetning ved en konsentrasjon på 15 mg/ml, nevnte mannitol er til stede i nevnte farmasøytiske sammensetning ved en konsentrasjon på 25,5 mg/ml og nevnte tertiære butylalkohol er tilstede i nevnte farmasøytiske sammensetning ved en konsentrasjon på 30% (volum/volum).
- 10 6. Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvor den lyofiliserte farmasøytiske sammensetningen inneholder ikke mer enn 0,5% bendamustin-etyler.
7. Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor den lyofiliserte farmasøytiske  
15 sammensetningen inneholder ikke mer enn 0,5% bendamustin-etyler.
8. Fremgangsmåte ifølge krav 5, hvor den lyofiliserte farmasøytiske sammensetningen inneholder ikke mer enn 0,5% bendamustin-etyler.
- 20 9. Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvor lyofiliseringen omfatter
- i) frysing av den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 1 til - 50 °C for å danne den frosne oppløsningen;
  - ii) holding av den frosne oppløsningen ved - 50 °C i minst 2 timer til 4 timer;
  - iii) økning av temperaturen i den frosne oppløsningen til en primær  
25 tørketemperatur på mellom - 20 °C og - 12 °C for å danne en tørket oppløsning;
  - iv) holding av oppløsningen ved den primære tørketemperaturen i 10 til 48 timer;
  - v) økning av temperaturen i den tørkede oppløsningen til en sekundær tørketemperatur på mellom 25 °C og 40 °C; og
  - vi) holding av oppløsningen ved den sekundære tørketemperaturen i minst 5 timer  
30 opp til 20 timer for å danne den lyofiliserte farmasøytiske sammensetningen.

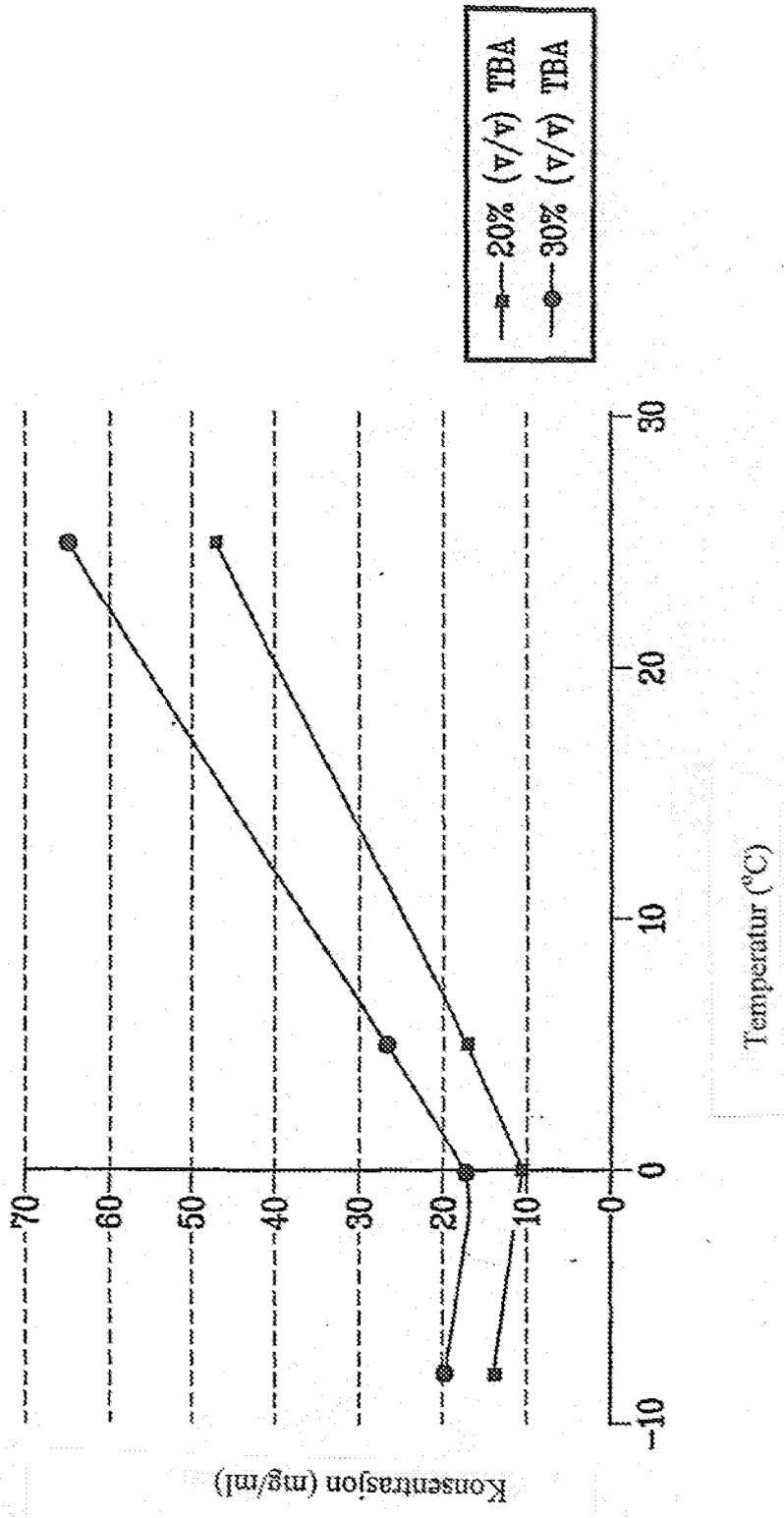


FIG. 1

2/6

Renhet av bendamustin etter 24 timer ved 5°C i forskjellige  
alkohol/vann ko-løsningsmidler

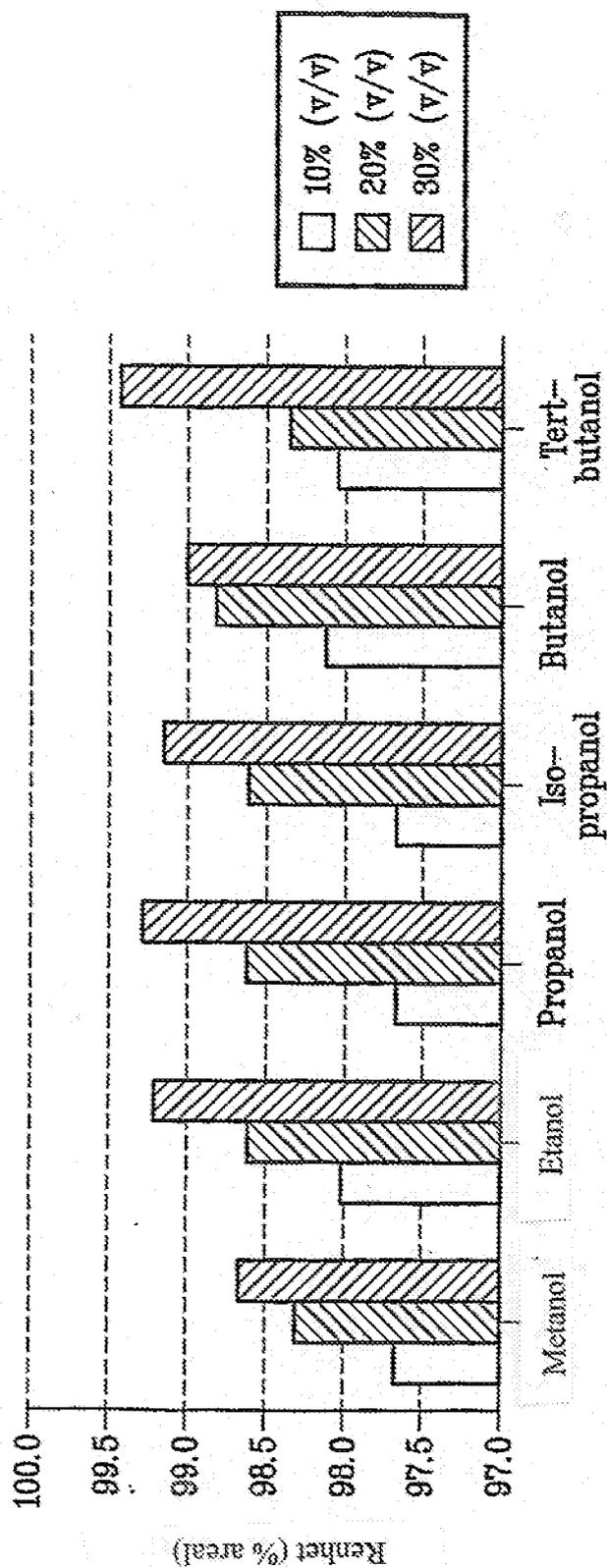


FIG. 2

HP1-informasjon etter 24 timer lagring ved 5°C i forskjellige alkohol/vann ko-løsningsmidler

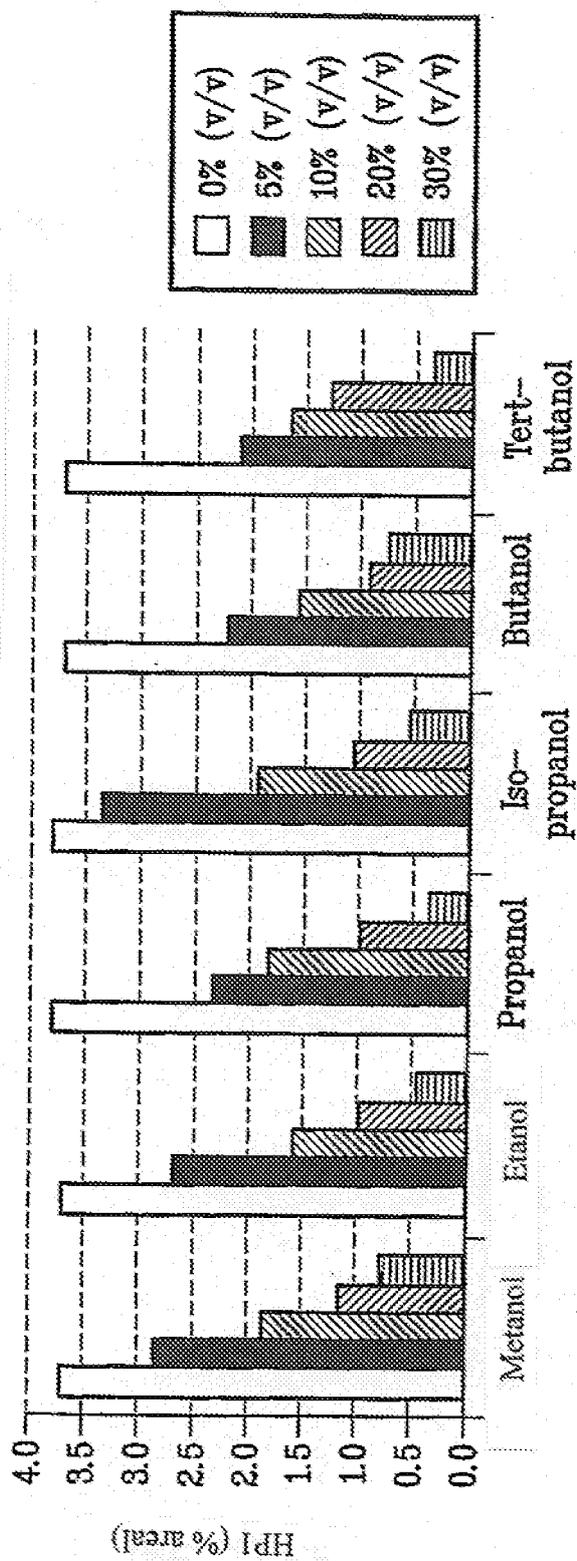


FIG. 3

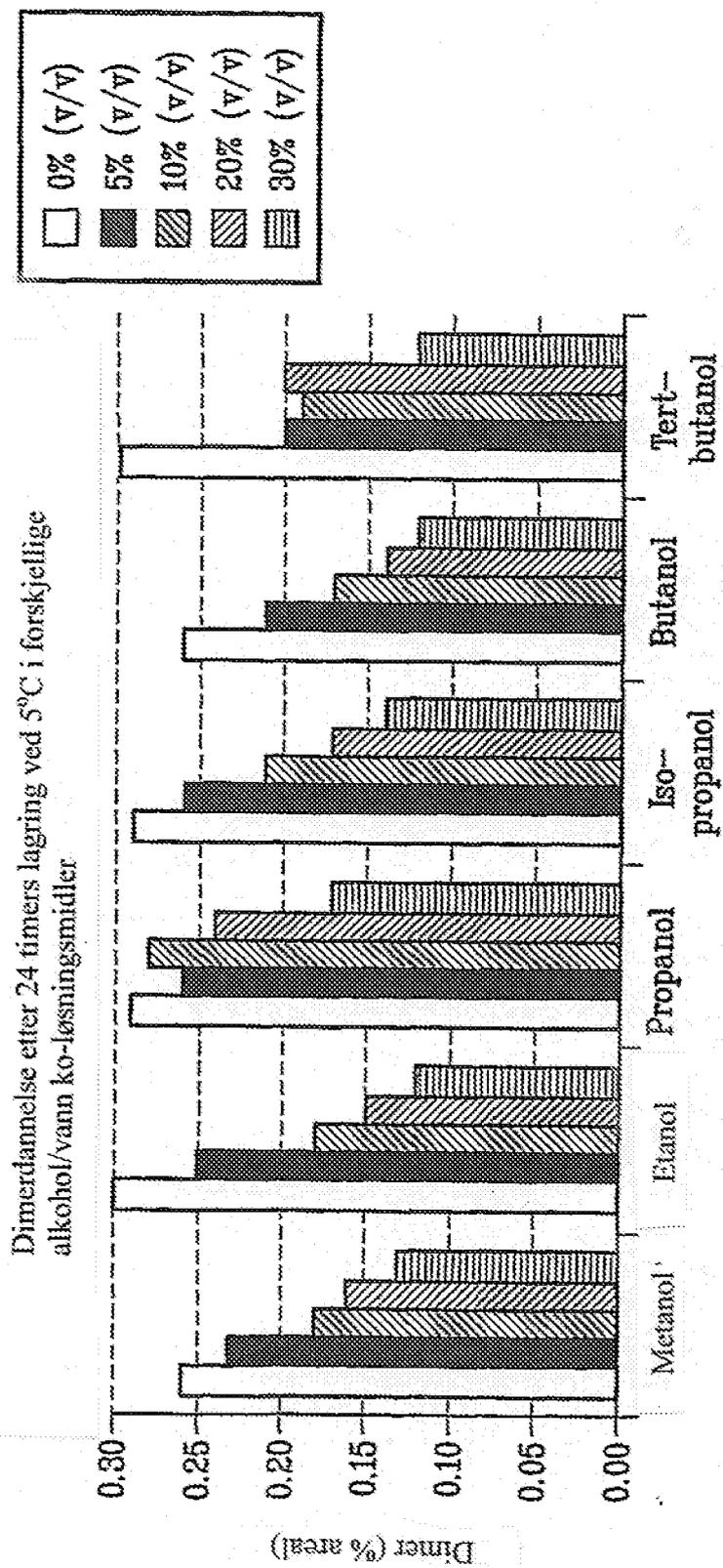


FIG. 4

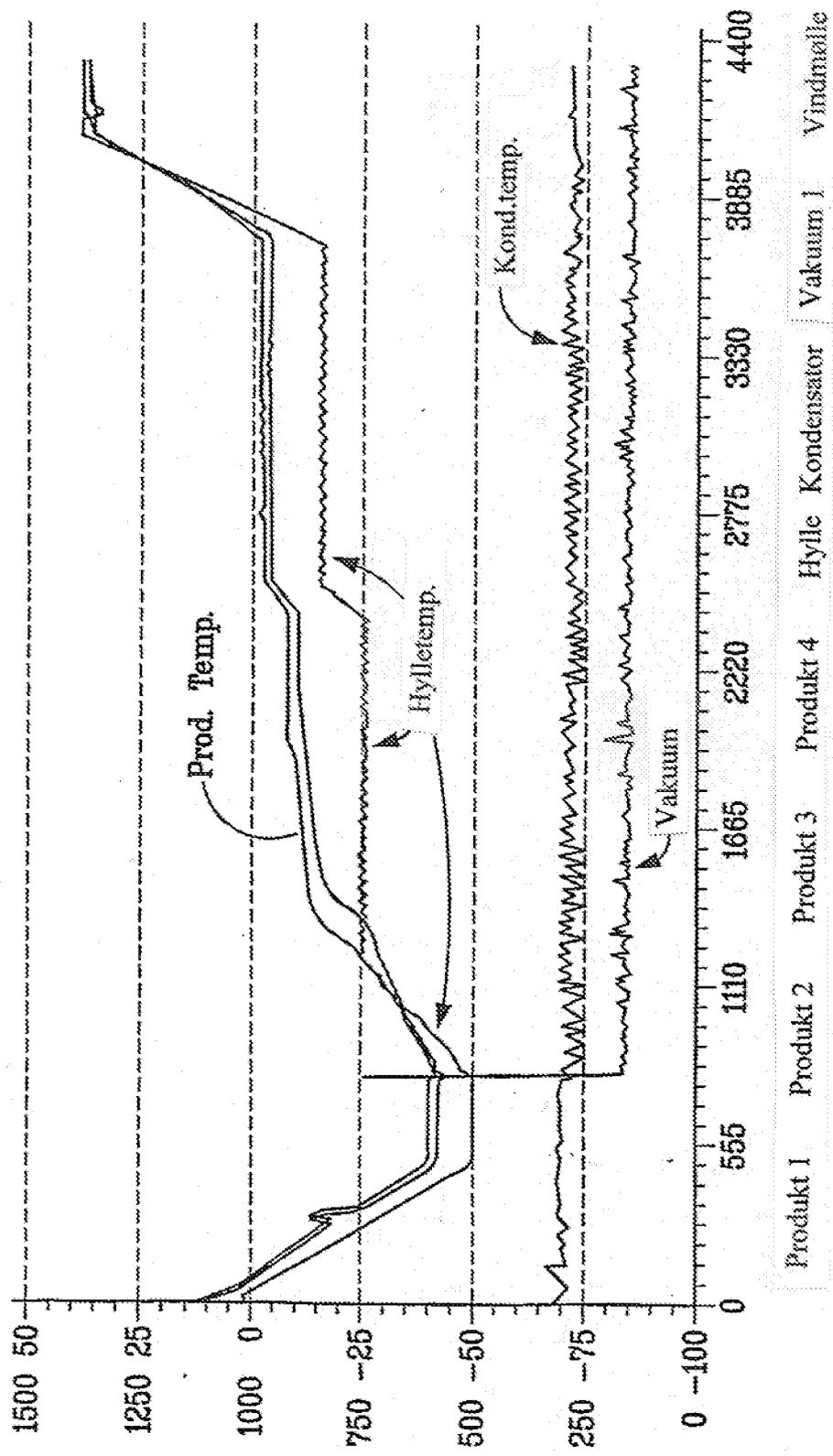


FIG. 5

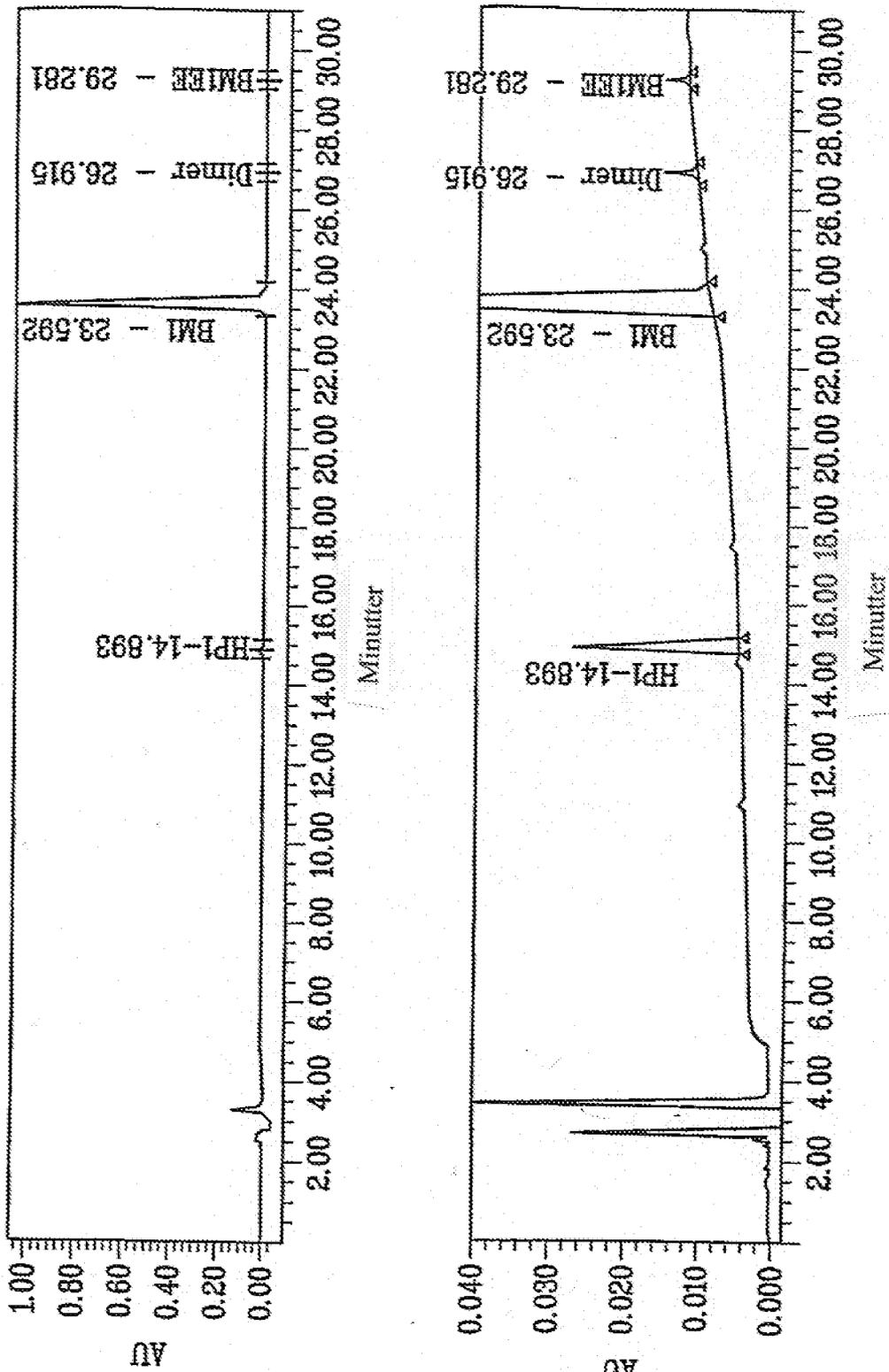


FIG. 6