

columns were kept identical. Eluent: A: 0.05 M KH_2PO_4 , pH = 2.5 (H_3PO_4); B: CH_3OH Gradient (linear): 0–35 min from 90% A to 55% A, 35–40 min to 40% A; 40–60 min to 40% A; 60–70 min to 25% A, 70–80 min to 20% A. Flow rate: 0.7 ml/min. Temperature: If not otherwise stated the experiments were performed at room temperature. Other selected temperatures have been adjusted by a column thermostat. Sample volume: 20 μl . Absorbance: 285 nm. HPLC system: Gradient system 600 E (Fa. Millipore Waters), diode array detector 990 (Fa. Millipore Waters), HPLC-column thermostat 5–85 °C (Fa. Knauer).

3.2.2. Peak identification

Retention times and UV-spectra of reference substances have been used to identify the peaks in the chromatograms. The different reference substances have been checked by ^1H - and ^{13}C -NMR-spectroscopy.

3.3. Solid phase NMR spectroscopy

NMR-Unit: Bruker AMX 300 with a CP-MAS Unit.

3.3.1. ^{29}Si -CP-MAS-NMR

Measuring frequency: 59.63 MHz. Proton resonance: 300.14 MHz. Optimal contact-time: 20000 μsec for LiChrospher 60 RP-select B, 5000 μsec for Nucleosil 100 AB.

3.3.2. ^{13}C -CP-MAS-NMR

Measuring frequency: 75.48 MHz. Proton resonance: 300.14 MHz. Optimal contact-time: 2000 μsec for Nucleosil 100 AB, 2000 μsec for LiChrospher 60 RP-select B, 2000 μsec for Eurospher 100.

Acknowledgement: We are most grateful to our colleague Mr. Lubda (Fa. Merck) for running the CP-MAS-NMR spectra.

References

- Gilpin, R. K.; Burke, M. F.: Anal. Chem. **45**, 1383 (1973)
- Dorsey, J. G.; Dill, K. A.: Chem. Rev. **89**, 331 (1989)
- Eisenbeiß, F.: Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **93**, 1019 (1989)
- Morterra, C.; Low, M. J. D.: J. Catal. **28**, 265 (1973)
- Waksmundzki, A.; Rudzinski, W.; Suprynowicz, Z.; Lebeda, R.: J. Chromatogr. **92**, 9 (1974)
- Karger, B. L.; Le Page, J. N.; Tanaka, N.; in: Horvath, Cs.; (Ed.): High-Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives, Vol. 1, S. 159, Academic Press, New York 1980
- Nakum, A.; Horvath, C.; J. Chromatogr. **203**, 53 (1981)
- Köhler, J.; Kirkland, J. J.: Chromatogr. **385**, 125 (1987)
- Köhler, J.; Chase, D. B.; Farlee, R. D.; Vega, A. J.; Kirkland, J. J.: J. Chromatogr. **352**, 275 (1986)
- Unger, K. K.: Porous Silica, Journal of Chromatography Library, Vol. 16, Elsevier, Amsterdam 1979
- Pfleiderer, B.; Albert, K.; Bayer, E.: J. Chromatogr. **506**, 343 (1990)
- Sinsdorf, D. W.; Maciel, G. E.: J. Am. Chem. Soc. **105**, 1487 (1983)
- Sinsdorf, D. W.; Maciel, G. E.: J. Am. Chem. Soc. **103**, 4263 (1981)
- Bayer, E.; Albert, K.; Reiners, J.; Nieder, M.; Müller, D.: J. Chromatogr. **264**, 197 (1983)
- Szabo, K.; Le Ha, N.; Schneider, P.; Zeltner, P.; Kovats, E.: Helv. Chim. Acta **67**, 2128 (1984)
- Hetem, M.; van de Ven, L.; de Haan, J.; Cramers, C.; Albert, K.; Bayer, E.: J. Chromatogr. **479**, 269 (1989)
- Kinkel, J. N.; Unger, K. K.: J. Chromatogr. **316**, 193 (1984)
- Sokolowski, A.; Wahlund, K.-G.: J. Chromatogr. **189**, 299 (1980)
- Freytag, W. E.; Stapf, W.: Pharm. Ztg. Wiss. **6/138**, 126 (1993)
- Fulde, G.: Dissertation Marburg 1993
- Jones, R. R.; Harkrader, R. J.; Southard, G. L.: J. Nat. Prod. **49**, 1109 (1986)
- Berthold, A.: J. Chromatogr. **549**, 1 (1991)
- Unger, K. K.: Porous Silica, Journal of Chromatography, Library, Vol. 16, S. 102, Elsevier, Amsterdam 1979
- Sander, L. C.; Wise, S. A.: Anal. Chem. **56**, 504 (1984)

Received January 27, 1994
Accepted March 20, 1994

Dr. Hanns Häberlein
Institut für Pharmazeutische Biologie
der Philipps-Universität Marburg
Deutschhausstraße 17 $\frac{1}{2}$
D-35037 Marburg

Apotheke¹, III. Medizinische Klinik und Poliklinik Abteilung Hämatologie², des Klinikums der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Stabilität von Bendamustinhydrochlorid in Infusionslösungen

BIRGIT MAAS¹, C. HUBER² und IRENE KRÄMER¹

Bendamustinhydrochlorid wurde mittels Reversed Phase HPLC bestimmt. Die chemische Stabilität (t_{90}) des Zytostatikums (0,25 mg/ml) beträgt in 0,9% Kochsalzlösung bei 4 °C 120 h und bei 23 °C 9 h. Stabilitätsbeeinflussende Faktoren sind pH-Wert, Temperatur und Chloridionenkonzentration. Kochsalzlösung 0,9% ist als Trägerlösung für Bendamustin-Infusionslösungen einzusetzen. Die Stabilitätszeiträume gewährleisten eine unproblematische Aufbewahrung und Applikation in der klinischen Praxis.

Stability of bendamustine hydrochloride in infusions

The stability of bendamustine hydrochloride (0,25 mg/ml) in 0,9% sodium chloride was studied after storage at 4 °C and 23 °C using Reversed Phase HPLC. Bendamustinhydrochloride is stable at 4 °C for 120 h and at 23 °C for 9 h. Temperature, pH and chloride concentration are important factors which influence stability. Isotonic sodium chloride must be used for the preparation of bendamustine hydrochloride infusions.

1. Einleitung

Bendamustin (Ribomustin® 4-[5-Bis(2-chlorethyl)aminol-

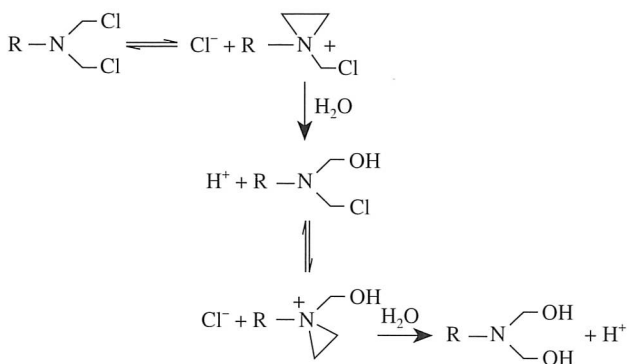
motherapeutikum in der Behandlung maligner Erkrankungen. Die Stabilität der lyophilisierten Trockensubstanz ist bereits bekannt [1]. Im Rahmen von Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Bendamustin am Menschen wurden auch *in vitro*-Messungen zur Stabilität der gelösten Substanz bei einer Temperatur von 37 °C in gepuffertem Medium (pH = 7,5; t_{50} = 6,2 min) und in heparinisierem Plasma (t_{90} = 1,67 h) durchgeführt [2]. Es fehlen aber bislang Angaben zur Haltbarkeit von Bendamustin-Infusionslösungen. Da die Herstellung patientenbezogener, applikationsfertiger Zytostatika-Injektions- oder -Infusionslösungen immer häufiger durch eine zentrale Zytostatikazubereitung in der Krankenhausapotheke erfolgt und die Infusion nicht mehr unmittelbar vor ihrer Applikation zubereitet wird, sind Kenntnisse zur Stabilität von Bendamustinhydrochlorid in wässriger Lösung erforderlich [3].

2. Untersuchungen und Ergebnisse

Bendamustinhydrochlorid ist in wässriger Lösung sehr instabil. In schwach saurer, neutraler sowie alkalischer Lösung erfolgt eine Hydrolyse der Bis-2-Chlorethylaminofunktion. Analog der Hydrolyse von Melphalan entsteht vermutlich über ein Aziridium-Kation zunächst das Monohydroxybendamustin und nachfolgend das Dihydroxyderivat (Schema) [4].

Neben dem pH-Wert hat die Chloridionenkonzentration einen wesentlichen Einfluß auf die Lage des Hydrolysegleichgewichtes. Mit steigender Chloridionenkonzentration sollte bevorzugt die Regeneration des Bendamustinhydrochlorids erfolgen, wodurch die Bildung des Hydroxyderivates zurückgedrängt wird. Für Melphalan ist die Abhängigkeit des Hydrolysegleichgewichtes von der Chloridionenkonzentration [5] und der Temperatur dokumentiert [4]. In Kenntnis dieser Zusammenhänge für das strukturverwandte Melphalan und unter dem Aspekt der Anwendung am Patienten als Infusion erscheint isotonische Natriumchloridlösung als Trägerlösung für Bendamustinhydrochlorid geeignet. Ungünstig ist allerdings die nur mäßige Löslichkeit der Substanz in diesem Medium, so daß die Zersetzung bereits während des zeitaufwendigen Lösevorgangs beginnt. In reinem Wasser ist Bendamustinhydrochlorid gut löslich. Es empfiehlt sich daher das Lösen in einer geringen Menge Wasser für Injektionszwecke und das sofortige Verdünnen mit isotonischer Natriumchloridlösung.

Schema



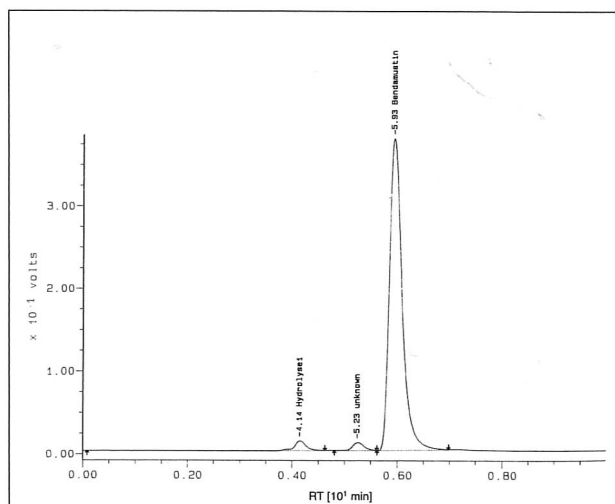
Aufgrund entsprechender Vorversuche wurden folgende Bedingungen für die Stabilitätsuntersuchungen gewählt: 25 mg Bendamustinhydrochlorid (= 1 Ampulle Ribomustin®) wurden zunächst in 10 ml Wasser gelöst und anschließend mit 0,9% Natriumchloridlösung zu 100 ml verdünnt. Die damit hergestellte Konzentration von 0,25 mg/ml entspricht therapeutischen Erfordernissen. Die Stabilitätsuntersuchung wurde bei Temperaturen von 4 °C und 23 °C durchgeführt. Die Bestimmung von Bendamustinhydrochlorid erfolgt mittels Reversed Phase HPLC. Der für Bendamustin charakteristische Peak (Abb.) erscheint bei einer Retentionszeit (RT) von 5,93 min. Das erste Zersetzungsprodukt, vermutlich das Monohydrolyseprodukt, erscheint mit einer RT von 4,14 min. Bei dem als „unknown“ bezeichneten Peak bei einer RT von 5,23 min handelt es sich um ein Nebenprodukt aus der Synthese. Mittlerweile ist es durch Optimierung des Syntheseverfahrens gelungen, die Verunreinigung völlig zu eliminieren [6]. Die Fläche dieses Peaks ändert sich während der gesamten Analysezeit nicht. Nach einer Aufbewahrungszeit von 119 h ist im Chromatogramm neben der deutlichen Zunahme des Monohydroxyderivates ein vierter Peak bei einer RT von 3,78 min zu erkennen, wobei es sich um das Dihydroxyderivat handelt. Mit einer Probe der kürzlich als Dihydroxyderivat charakterisierten Verbindung [7] war es möglich, dieses Zersetzungsprodukt in unserem HPLC Assay zu identifizieren.

Aufgrund der rasch fortschreitenden Hydrolyse von wäßrigen Bendamustinhydrochloridlösungen dürfen bei allen chromatographischen Bestimmungen und entsprechenden Validierungen nur frisch hergestellte Lösungen verwendet werden, die unmittelbar nach ihrer Zubereitung injiziert werden müssen. Sämtliche Standardproben zur Validierung der Methode wurden mit Ribomustin® durchgeführt. Die Meßergebnisse erlauben somit eine relative Aussage zur Stabilität von Benda-

vor Versuchsbeginn hatte die frisch hergestellte Untersuchungslösung einen pH-Wert von 4. Die Bestimmung der Zersetzung von Bendamustinhydrochlorid-Infusionslösungen erfolgte zunächst bei 4 °C. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Geschwindigkeitskonstante (1k) und die Zeit bis zum Verlust von 10% wurden mittels exponentieller Regression berechnet. Für 1k ergab sich ein Wert von $-0,00093 \text{ h}^{-1}$. Der Korrelationskoeffizient wurde mit 0,9892 ermittelt. Hieraus errechnet sich für die Stabilität (t_{90}) von Bendamustinhydrochlorid in Natriumchloridlösung 0,81% bei 4 °C ein Wert von 118,5 h. Weiterhin wurde die Stabilität von Bendamustinhydrochlorid-Infusionslösung bei 23 °C bestimmt. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Geschwindigkeitskonstante (1k) und die Zeit bis zum Verlust von 10% (t_{90}) wurden mittels exponentieller Regression berechnet. Für 1k ergab sich ein Wert von $-0,01165 \text{ h}^{-1}$ (Korrelationskoeffizient 0,9985). Hieraus errechnet sich für die Stabilität von Bendamustinhydrochlorid (t_{90}) in Natriumchloridlösung 0,81% bei 23 °C ein Wert von 9,2 h.

Tabelle 1: Stabilitätsdaten für Bendamustinhydrochlorid bei 4 °C

Zeit [h]	Mittelwert der gemessenen Konzentrationen an Bendamustin-HCl [mg/ml] für n = 9	Standardabweichung [%]	Variationskoeffizient [%]	Gehalt an Bendamustin-HCl [%] ($t_0 = 100\%$)
0,00	0,2499	0,00160	0,64	100
19,77	0,2478	0,00175	0,71	99,14
42,57	0,2422	0,00230	0,95	96,22
71,63	0,2369	0,00047	0,20	94,79
92,55	0,2316	0,00052	0,22	92,68
118,27	0,2232	0,00049	0,22	89,29



Zeit [h]	Mittelwert der gemessenen Konzentrationen an Bendamustin-HCl [mg/ml] für n = 9	Standardabweichung [%]	Variationskoeffizient [%]	Gehalt an Bendamustin-HCl [%] ($t_0 = 100\%$)
0,00	0,2499	0,00160	0,64	100
19,77	0,2478	0,00175	0,71	99,14
42,52	0,2422	0,00230	0,95	96,22
71,63	0,2369	0,00047	0,20	94,79
92,55	0,2316	0,00052	0,22	92,68
118,27	0,2232	0,00049	0,22	89,29

Abb.: HPLC-Chromatogramm von Bendamustinhydrochlorid (0,25 mg/ml in NaCl 0,81% unmittelbar nach Verdünnung)

Tabelle 2: Stabilitätsdaten für Bendamustinhydrochlorid bei 23 °C

Zeit [h]	Mittelwert der gemessenen Konzentration an Bendamustin-HCl [mg/ml] für n = 3	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]	Gehalt an Bendamustin-HCl [%] (t ₀ = 100%)
0,00	0,2525	0,00107	0,43	100
0,67	0,2508	0,00212	0,85	99,31
4,17	0,2401	0,00130	0,54	95,06
6,33	0,2375	0,00211	0,89	94,04
10,25	0,2243	0,00404	1,80	88,84
21,50	0,1966	0,00139	0,71	77,87

3. Diskussion

Die Messungen zeigen, daß sowohl bei 4 °C als auch 23 °C die hydrolytische Zersetzung wäßriger Bendamustinhydrochloridlösungen in dem gemessenen Bereich linear verläuft. Für die Zersetzung von Melphalan ist eine Kinetik pseudoerster Ordnung beschrieben [8], die aufgrund des identischen Hydrolysemechanismus auch für das strukturverwandte Bendamustin angenommen werden kann. Die mittels exponentieller Regression berechneten Korrelationskoeffizienten unterstützen diese Annahme. Neueste Untersuchungen zur Hydrolysekinetik von Bendamustin in Wasser bei Raumtemperatur über den gesamten Zersetzungszeitraum verifizieren die Zersetzungs kinetik pseudo-erster Ordnung [7]. Alle Untersuchungslösungen wiesen den stabilitätsbegünstigenden pH-Wert von 4 auf. In Vorversuchen wurde die Hydrolyse von Bendamustinhydrochlorid in Wasser für Injektionszwecke überprüft, wobei gezeigt werden konnte, daß in diesem chloridfreien Medium das Ausmaß der Hydrolyse trotz gleichen pH-Wertes wesentlich größer ist. Für Lösungen der Ausgangskonzentration 0,25 mg/ml wurde bei Raumtemperatur exemplarisch eine t₉₀ von 4,2 h bestimmt. Dies belegt den stabilitätserhöhenden Einfluß der Chloridionen. Als Trägermedium für Bendamustinzubereitung ist ausschließlich isotonische Natriumchloridlösung zu verwenden.

Die Hydrolyse von Bendamustinhydrochlorid ist erwartungsgemäß stark temperaturabhängig. Die Stabilität der Lösung mit einer Konzentration von 0,25 mg/ml ist bei 4 °C (t₉₀ = 118,5 h) um mehr als das Zehnfache größer als bei 23 °C (t₉₀ = 9,2 h). Für die klinische Praxis bedeutet dies, daß Bendamustin-Infusionslösungen kühl zu lagern sind. Mit physiologischer Kochsalzlösung als Trägermedium und unter Aufbewahrung im Kühlschrank ist für Bendamustininlösungen der Konzentration 0,25 mg/ml eine Haltbarkeit von vier d gegeben, so daß eine Versorgung mit applikationsfertigen Bendamustin-Infusionslösungen im Rahmen einer zentralen Zytostatikazubereitung durch die Krankenhausapotheke sicher möglich ist. Für die empfohlene Applikation als Kurzzeitinfusion über 30 min sind ebenfalls keine Stabilitätsprobleme zu erwarten, da bei Raumtemperatur für diese Bendamustinzubereitungen eine Stabilität von 9 h gegeben ist.

4. Experimenteller Teil

4.1. Substanzen

Die Bestimmungen wurden mit Ribomustin-Ampullen der Firma ribosepharm (Charge 0190393) durchgeführt. Jede Durchstechflasche mit 55 mg Trockensubstanz enthält 25 mg Bendamustinhydrochlorid (Hilfsstoff: Mannitol).

4.2. Chromatographische Bedingungen

Die Messung erfolgte mit einer Millipore/Waters HPLC-Anlage. Pumpe: Waters 510 HPLC-Pump, Detektor: UV-Detektor Waters 490 E, Probenheber: Waters 717 Autosampler, Säule: Waters Novaapak C 18, 60 Å

H₂SO₄, Methanol 40/60 (V/V), Flußrate: 0,3 ml/min, Wellenlänge: 254 mm, Injektionsvolumen: 10 µl, Meßtemperatur: 4 °C bzw. 23 °C.

4.3. Präzision des Gerätes und der Methode

Sechs Einzelinjektionen aus sechs jeweils frisch hergestellten Referenzlösungen der Konzentration 0,25 mg/ml werden bezüglich ermittelter Konzentration und Retentionszeit ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Präzision des Gerätes und der Methode

Probe Nr.	Menge [mg]	Retentionszeit [mg]
1	0,2499	5,93
2	0,2494	5,92
3	0,2497	5,92
4	0,2493	5,94
5	0,2486	5,93
6	0,2492	5,93
Mittelwert	0,2494	5,93
Standardabweichung	0,000433	0,0063
Variationskoeffizient	0,2%	0,1%

4.4. Eichung des Systems

Die Eichung des Systems erfolgt mittels Mehrpunkteichung mit externem Standard. Es werden je drei Injektionen von 10%, 100% und 200% der zu bestimmenden Konzentration ausgeführt (Tabelle 4). Dazu wird eine Ampulle Ribomustin® zunächst in 10 ml H₂O gelöst und anschließend mit NaCl 0,9% zu 0,025 mg/ml, 0,25 mg/ml und 0,50 mg/ml verdünnt. Die Eichgerade ergibt sich aus den berechneten Peakflächen, aufgetragen gegen die theoretische Konzentration. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,9997.

Tabelle 4: Eichung des Systems

Theoretisch Konzentration [mg/ml]	Mittelwert der gefundenen Konzentrationen für n = 3 [mg/ml]	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
0,025	0,0266	0,00036	1,4
0,25	0,2499	0,0016	0,6
0,50	0,5080	0,0021	0,4

4.5. Probenvorbereitung

Jeweils eine Ampulle Ribomustin® (4.1) wird in 10 ml Wasser für Injektionszwecke gelöst und anschließend mit NaCl-Lösung aus Vialflex® Beuteln der Firma Baxter (pH-Wert: 5,0–7,0) zu 100 ml verdünnt. Daraus resultiert eine NaCl-Konzentration von 0,81%. Die Zubereitung der Standardproben zur Erstellung der Eichgeraden erfolgt entsprechend.

4.6. Auswertung

Die Auswertung erfolgt durch automatische Peakflächenintegration mittels Eichgerade (Software Waters Maxima 820).

Literatur

- 1 Ribomustin® Standardinformation für Krankenhausapotheker April 1993
- 2 Preiss, R.; Sohr, R.; Matthias, M.; Brockmann, B.; Hüller, H.: Pharmazie **40**, 782 (1985)
- 3 Krämer, I.: Krankenhauspharmazie **8**, 325 (1990)
- 4 Stout, S. A.; Riley, C. M.: Int. J. Pharm. **24**, 193 (1985)
- 5 Chang, S. Y.; Evans, T. S.; Alberts, D. S.; J. Pharm. Pharmacol. **31**, 853 (1979)
- 6 Persönliche Mitteilung der Firma ribosepharm 1994
- 7 Gust, R.: Unveröffentlichte Ergebnisse (Institut für Pharmazie, Universität Regensburg)
- 8 Flora, K. P.; Smith, S. L.; Cradock, J. C.: J. Chromatogr. **177**, 91 (1979)

Eingegangen am 8. Juni 1994
Angenommen am 4. Juli 1994

Dr. Irene Krämer
Apotheke des Klinikums
Langenbeckstr. 1

Pharmacy¹, III. Medical Clinic and Polyclinic, Division of Hematology², of the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz

Stability of Bendamustine Hydrochloride in Infusions

BIRGIT MAAS¹, C. HUBER² AND IRENE KRAMER¹

Bendamustine hydrochloride was identified by means of reverse-phase HPLC. The chemical stability (t_{90}) of the cytostatic (0.25 mg/mL) in 0.9% sodium chloride is 120 h at 4°C and 9 h at 23°C. The pH value, temperature, and chloride ion concentration are influencing factors for stability. 0.9% sodium chloride solution must be used as the carrier solution for bendamustine infusion solution. The stability times ensure unproblematic storage and application in clinical practice.

Stability of bendamustine hydrochloride in infusions

The stability of bendamustine hydrochloride (0.25 mg/mL) in 0.9% sodium chloride was studied after storage at 4°C and 23°C using reverse-phase HPLC. Bendamustine hydrochloride is stable at 4°C for 120 h and at 23°C for 9 h. Temperature, pH, and chloride concentration are key influencing factors for stability. Isotonic sodium chloride must be used for the preparation of bendamustine hydrochloride infusions.

1. Introduction

Bendamustine (Ribomustin®, 4-[5-bis(2-chlorethyl)amino]-1-methyl-2-benzimidazolyl butyric acid) is an effective chemotherapeutic drug in the treatment of malignant diseases.

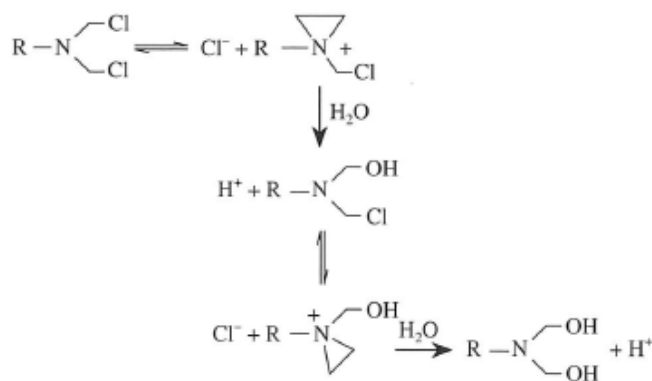
The stability of the lyophilized dry substance is already known [1]. In studies of the pharmacokinetics of bendamustine in humans, *in vitro* measurements of the dissolved substance were carried out at a temperature of 37°C in a buffered medium (pH = 7.5; t_{50} = 6.2 min) and in heparinized plasma (t_{90} = 1.67 h) [2]. However, data is still lacking on the stability of bendamustine infusions. Since patient-specific, ready-to-use cytostatic infusions or injections are increasingly prepared in a central cytostatic preparation facility in the hospital pharmacy and the infusion is no longer prepared immediately before administration, information on the stability of bendamustine hydrochloride in an aqueous solution is imperative [3].

2. Tests and results

Bendamustine is very unstable in an aqueous solution. In a weakly acid, neutral, and alkaline solution, hydrolysis of the bis-2-chlorethylamino function occurs. As in the hydrolysis of melphalan, monohydroxy bendamustine presumably develops first via an aziridium cation, and then the dihydroxy derivative develops (see diagram) [4]. In a highly acidic solution, hydrolysis is inhibited by protonation of the free electron pair on the nitrogen. In addition to the pH value, the chloride ion concentration has a significant impact on the hydrolysis equilibrium. It is preferred that the bendamustine hydrochloride be regenerated as the chloride ion concentration increases, which suppresses the formation of the hydroxyl derivative. The

dependence of the hydrolysis equilibrium on the chloride ion concentration [5] and temperature [4] is documented for melphalan. On account of these relationships for the structurally related melphalan and the fact that it is administered to the patient as an infusion, isotonic sodium chloride solution seems to be suitable as a carrier solution for bendamustine hydrochloride. The merely moderate solubility of the substance in this medium is, however, unfavorable, because decomposition already begins during the time-consuming dissolution process. In pure water, bendamustine has good solubility. It is therefore recommended that it be dissolved in a small amount of water for injection and then immediately diluted with an isotonic sodium chloride solution.

Diagram



Based on corresponding preliminary tests, the following conditions were selected for stability testing: 25 mg of bendamustine hydrochloride (= 1 ampoule of Ribomustin®) was dissolved first in 10 mL of water and then diluted with 0.9% sodium chloride solution to 100 mL. The produced concentration of 0.25 mg/mL meets therapeutic requirements. The stability test was performed at temperatures of 4°C and 23°C. The bendamustine hydrochloride was identified by reverse-phase HPLC. The characteristic peak of bendamustine (see figure) occurs at a retention time (RT) of 5.93 min. The first decomposition product, presumably the monohydrolysis product, appears at an RT of 4.14 min. The “unknown” peak at an RT of 5.23 min is a by-product from synthesis. By optimizing the synthesis procedure in the meantime, we have been able to completely eliminate the impurity [6]. The area of this peak does not change during the entire time of analysis. After a storage time of 119 h, in addition to the clear increase in the monohydroxy derivative, a fourth peak can be seen at an RT of 3.78 min, which is the dihydroxy derivative. With a sample of the compound recently characterized as a dihydroxy derivative [7], we were able to identify this decomposition product in our HPLC assay.

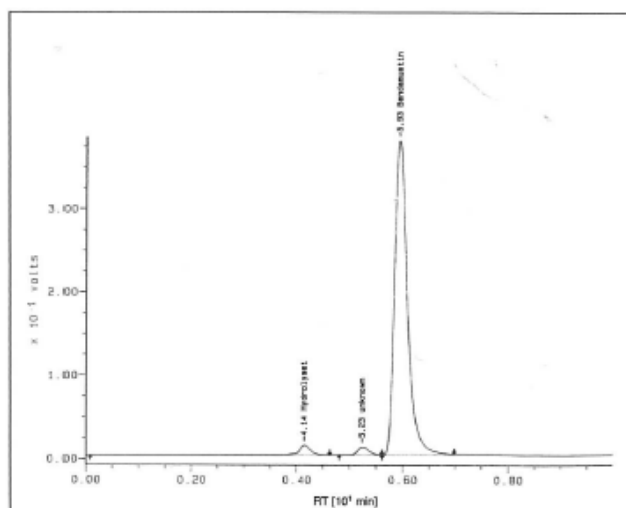
Due to the rapid hydrolysis of aqueous bendamustine hydrochloride solutions, only freshly prepared solutions which must be injected immediately following their preparation may be used in chromatographic determinations and corresponding validations. All standard samples for validation of the method were performed with Ribomustin®. The measurement results thus allow us to determine the relative stability of bendamustine, which is sufficient for our investigation.

Before the start of testing, the freshly prepared test solution had a pH of 4. The decomposition of bendamustine hydrochloride infusions was determined first at 4°C. The measurement results are shown in Table 1. The rate constant (¹k) and the time to 10% loss were calculated by means of exponential regression. A value of -0.00093 h⁻¹ was obtained for ¹k. The coefficient of correlation was determined as 0.9892. This calculated to a value of 118.5 h

for the stability (t₉₀) of bendamustine hydrochloride in a 0.81% sodium chloride solution at 4°C. The stability of bendamustine hydrochloride infusion solution was also determined at 23°C. The measurement results are shown in Table 2. The rate constant (¹k) and time to 10% loss (t₉₀) were calculated by means of exponential regression. A value of -0.01165 h⁻¹ was obtained for ¹k (coefficient of correlation 0.9985). This calculated to a value of 9.2 h for the stability of bendamustine hydrochloride (t₉₀) in a 0.81% sodium chloride solution at 23°C.

Table 1: Stability data for bendamustine hydrochloride at 4°C

Time [h]	Mean Concentration of Bendamustine HCl [mg/mL] Measured for n = 9	Standard Deviation	Coefficient of Variation [%]	Content of Bendamustine HCl [%] (t ₀ = 100%)
0.00	0.2499	0.00160	0.64	100
19.77	0.2478	0.00175	0.71	99.14
42.57	0.2422	0.00230	0.95	96.22
71.63	0.2369	0.00047	0.20	94.79
92.55	0.2316	0.00052	0.22	92.68
118.27	0.2232	0.00049	0.22	89.29



Zeit [h]	Mittelwert der gemessenen Konzentrationen an Bendamustin-HCl [mg/ml] für n = 9	Standardabweichung [%]	Variationskoeffizient	Gehalt an Bendamustin-HCl [%] (t ₀ = 100%)
0,00	0,2499	0,00160	0,64	100
19,77	0,2478	0,00175	0,71	99,14
42,52	0,2422	0,00230	0,95	96,22
71,63	0,2369	0,00047	0,20	94,79
92,55	0,2316	0,00052	0,22	92,68
118,27	0,2232	0,00049	0,22	89,29

Figure: HPLC chromatogram of bendamustine hydrochloride (0.25 mg/mL in 0.81% NaCl immediately after dilution)

[Translator's note: See Table 1 for translation of figure.]

Explore Litigation Insights

Docket Alarm provides insights to develop a more informed litigation strategy and the peace of mind of knowing you're on top of things.

Real-Time Litigation Alerts



Keep your litigation team up-to-date with **real-time alerts** and advanced team management tools built for the enterprise, all while greatly reducing PACER spend.

Our comprehensive service means we can handle Federal, State, and Administrative courts across the country.

Advanced Docket Research



With over 230 million records, Docket Alarm's cloud-native docket research platform finds what other services can't. Coverage includes Federal, State, plus PTAB, TTAB, ITC and NLRB decisions, all in one place.

Identify arguments that have been successful in the past with full text, pinpoint searching. Link to case law cited within any court document via Fastcase.

Analytics At Your Fingertips



Learn what happened the last time a particular judge, opposing counsel or company faced cases similar to yours.

Advanced out-of-the-box PTAB and TTAB analytics are always at your fingertips.

API

Docket Alarm offers a powerful API (application programming interface) to developers that want to integrate case filings into their apps.

LAW FIRMS

Build custom dashboards for your attorneys and clients with live data direct from the court.

Automate many repetitive legal tasks like conflict checks, document management, and marketing.

FINANCIAL INSTITUTIONS

Litigation and bankruptcy checks for companies and debtors.

E-DISCOVERY AND LEGAL VENDORS

Sync your system to PACER to automate legal marketing.