

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **026709**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2017.05.31**

**(21)** Номер заявки  
**201201221**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2004.06.10**

**(51)** Int. Cl. *A61K 31/565* (2006.01)  
*A61K 31/575* (2006.01)  
*A61K 47/28* (2006.01)  
*A61K 9/16* (2006.01)  
*A61P 15/00* (2006.01)

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ ЭСТРАДИОЛА С МЕДЛЕННЫМ  
ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ (ВАРИАНТЫ)**

**(31)** 60/477,939

**(32)** 2003.06.13

**(33)** US

**(43)** 2014.02.28

**(62)** 200900451; 2004.06.10

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**САВУАР ДЖОН КЛОД (MX)**

**(72)** Изобретатель:  
**Савуар Джон Клод, Анхелес Урибе  
Хуан (MX)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** RU-C1-2095055

WO-A2-2002047693

WO-A1-1999043304

WO-A1-2002064168

TIKKANEN M.J. et al.: "Lipoprotein-associated estrogens". Cardiovasc Res, 2002 Nov; 56(2):184-188, (реферат) [он-лайн] [найден 04.02.2013]. Найдено из PubMed, PMID: 12393088

**(57)** Изобретение относится к способу получения композиции эстрадиола с медленным высвобождением, включающему (а) получение частиц, состоящих из 17-β-эстрадиола и холестерина в соотношении 1:1 между 17-β-эстрадиолом и холестерином, где каждый из них находится в аморфной или полиморфной форме; (b) воздействие атмосферы на указанные частицы из стадии (а) при относительной влажности 25% или менее в течение 24 ч; (с) воздействие атмосферы, насыщенной ацетоном и водой, на указанные частицы из стадии (b) в течение 72 ч при 60°C; (d) нагревание частиц из стадии (с) при 45°C в течение 42 ч, при этом скорость растворения 17-β-эстрадиола (СРЭ) из частиц, полученных на стадии (d), составляет менее чем 6% при измерении в водном растворе 0,3% мас./об. моноолеата полиоксиэтиленсорбитана (Tween80®) и очищенной согласно USP воде в течение 24 ч при 37°C и стандартном давлении. Композиция с медленным высвобождением, полученная способом по настоящему изобретению, дает двойные преимущества композиции с низкой дозой эстрадиола со схемой введения с низкой частотой. Композиция может вводиться парентерально один раз в месяц или с меньшей частотой.

**B1****026709****026709****B1**

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Для заявки на настоящий патент испрашивается приоритет согласно предварительной заявке с регистрационным № 60/477939, поданной 13 июня 2003 г.

Настоящее изобретение относится к способам получения композиций эстрадиола. Композиции составлены для продолжительного или замедленного высвобождения, облегчая введение с интервалами около четырех недель или более.

### **Предшествующий уровень техники**

Яичниковый/менструальный цикл представляет собой комплексное событие, характеризующееся богатой эстрогенами фолликулярной фазой и, после овуляции, богатой прогестероном лютеиновой фазой. Каждая фаза продолжается около 14 дней, приводя к интервалу между менструациями около 28 дней. Ткань эндометрия отвечает на изменения уровней гормонов.

Начало менструации представляет собой начало нового менструального цикла и считается как день первый. В течение периода времени от около пяти до семи дней, поверхностные слои эндометрия, которые росли и развивались в течение предшествующего яичникового/менструального цикла, отторгаются из-за гибели желтого тела в нефертильном менструальном цикле, ассоциированной с потерей секреции прогестерона. Происходит созревание фолликулов яичника, прогрессивно приводя к повышению циркулирующих уровней эстрогена, который в свою очередь приводит к новой пролиферации эндометрия.

Доминантный яичниковый фолликул подвергается овуляции в середине цикла, обычно между днями менструального цикла 12 и 16 и преобразуется из источника преимущественно эстрогенов в источник преимущественно прогестерона (желтое тело). Увеличение уровня прогестерона в крови приводит к преобразованию пролиферативного эндометрия в секреторную фазу, в которой пролиферация ткани быстро прекращается, приводя к образованию желез или органов эндометрия. Когда овулировавший овоцит жизнеспособно оплодотворен и продолжает прогрессивное эмбриональное дробление, секреторный эндометрий и оплодотворенное яйцо могут взаимодействовать, приводя к имплантации, начиная с около шести до восьми дней после оплодотворения.

Если продолжающаяся беременность укрепляется имплантацией, эмбрион прикрепляется и зарывается в секреторный эндометрий и начинает вырабатывать человеческий хорионический гонадотропин (чХГ). чХГ в свою очередь стимулирует продолжительное функционирование желтого тела, т.е. функция прогестерона остается повышенной и менструация не появляется в фертильном менструальном цикле. Затем устанавливается беременность.

В нефертильном менструальном цикле убывающий уровень прогестерона в крови вызывает отторжение ткани эндометрия. С этого начинается последующий менструальный цикл.

Так как пролиферация эндометрия служит для подготовки матки для предстоящей беременности, манипуляции с гормонами для состояния матки могут обеспечить контрацепцию. Например, известно, что эстрогены уменьшают секрецию фолликулостимулирующего гормона торможением по принципу обратной связи. В определенных условиях эстрогены также могут ингибировать секрецию лютеинизирующего гормона, также отрицательной обратной связью. В нормальных обстоятельствах пик циркулирующих эстрогенов, обнаруживаемый перед овуляцией, индуцирует выброс гонадотропных гормонов, который появляется непосредственно перед и приводит к овуляции. Высокие дозы эстрогена могут предотвратить оплодотворение, возможно из-за вмешательства в имплантацию.

Прогестины также могут обеспечивать контрацепцию. Эндогенный прогестерон отвечает за способствующие наступлению беременности изменения в эндометрии и циклические изменения клеток и тканей в шейке матки и влагалище. Введение прогестина делает шеечную слизь густой, тягучей и клеточной, что, считают, препятствует транспорту сперматозоидов. Введение прогестина также ингибирует секрецию лютеинизирующего гормона и блокирует овуляцию у людей.

В настоящее время на рынке существует ряд контрацептивных препаратов, которые могут быть классифицированы легко на несколько общих типов. Первые из них известны как монофазные композиции. Монофазные композиции содержат постоянное количество эстрогена и прогестина. Вредные побочные эффекты таблеток монофазных композиций зависят от баланса между эстрогенным и прогестинным компонентом таблетки. Например, при относительно преобладающей прогестиновой таблетке, композиция будет, с течением времени, приводить к истощению рецепторов и эстрогена, и прогестина. Результатом, который можно ожидать, является недостимулированный или атрофичный эндометрий, который может в конечном счете вызывать или аменорею на таблетках или прорывное кровотечение или "мазню" из-за плохой эпителизации. С другой стороны, при относительно преобладающем эстрогенном препарате, возможно, что длительное применение может привести к росту эндометрия с развитием незакрепленной хрупкой стромы и последующей "мазни" или прорывного кровотечения.

Новые композиции, известные как трехфазные, имеют варьирующийся уровень эстрогенов и прогестина; в большинстве случаев состоят из относительно постоянных уровней эстрогена и поэтапным увеличением прогестина на протяжении цикла. Такая особенность введения эстрогена и прогестина приводит к относительно доминантной эстрогеновой композиции в начале упаковки с увеличивающейся прогестагенной активностью по направлению к концу упаковки. Стабильность эндометрия может быть лучше с такими таблетками, так как эстрогенная активность в начале упаковки индуцирует и эстроген-

ные и прогестиновые рецепторы, делая эндометрий чувствительным к повышенному уровню прогестина по направлению к концу упаковки. Прогестиновая активность способствует более плотной, более стабильной строге эндометрия, хотя относительно продолжительная длительность воздействия прогестин-ов, по направлению к концу упаковки может все еще приводить к снижению рецепторов и активности эстрогена и прогестина.

Значительной проблемой этого типа композиций является низкая доза стероидов в начале упаковки, что делает эти таблетки чувствительными к лекарственным взаимодействиям, или возможность пропуска приема таблеток, что может привести к прорыву овуляции. Начало упаковки является критическим моментом в свете прорыва овуляции, так как потребитель только что завершил семидневный интервал без лекарственного средства, в течение которого могло начаться развитие фолликула. Даже если беременность не развивается, прорывная овуляция может приводить к плохой регуляции цикла.

17-β-эстрадиол (E<sub>2</sub>) является наиболее сильным натуральным эстрогеном, обнаруженным у человека, и является основным секреторным продуктом яичника. Он легко окисляется в организме до эстрогена E<sub>1</sub>, который, в свою очередь, может быть гидрирован до эстриола. Такие превращения имеют место главным образом в печени, где существует прямое взаимопревращение между E<sub>1</sub> и эстрадиолом. Все три из этих натуральных эстрогенов экскретируются в моче в виде глюкуронидов и сульфатов, вместе с множеством связанных меньших продуктов в водорастворимых комплексах. Широко известно, что после перорального введения микронизированного E<sub>2</sub>, увеличивающимся циркулирующим эстрогеном является преимущественно менее активный вид E<sub>1</sub>, который достигает пиковой концентрации во много раз выше, чем таковая E<sub>2</sub>. Превращение E<sub>2</sub> в E<sub>1</sub> и последовательно в другие метаболиты имеет место во время абсорбции из тонкого кишечника и прохождения через печень. Такой обширный метаболизм значительно ограничивает пероральную эффективность натуральных эстрогенов и их сложных эфиров. Действительно, из-за их ограниченной пероральной эффективности, E<sub>2</sub> и его сложные эфиры обычно вводят внутримышечными инъекциями.

Прогестерон (P<sub>4</sub>) представляет собой активный натуральный прогестин, который появляется в желтом теле, плаценте и коре надпочечников. Как E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> также неэффективен при пероральном введении из-за его быстрого метаболизма в эпителии тонкой кишки и в печени, и следовательно, является вводимым только внутримышечно.

Из-за их ограниченной пероральной эффективности, специалисты в области техники рассматривают эти натуральные женские половые гормоны как нежелательные в композиции орального контрацептива. Вместо этого, специалисты сосредоточены на создании и введении синтетических эстрогенов и прогестинов с целью контрацепции. Применение синтетических производных также заменило натуральные вещества в лечении менопаузы, угрожающего аборта и др. Однако, такие синтетические производные более вероятно вызывают токсические побочные эффекты, чем относительно безопасные эндогенные гормоны.

Тогда как химические модификации натуральных гормонов проявляют повышенную пероральную активность, они также могут вызывать множество нежелательных побочных эффектов. Например, известно, что синтетические производные натуральных гормонов обладают побочным стимулирующим воздействием на синтез белка печенью (возможно, способствуя тромбозу) и проявляют диабетогенный эффект, в противоположность натуральным половым гормонам.

Синтетический эстроген, например, быстро всасывается в желудке и кишечном тракте. Так как он легко метаболизируется, он быстро абсорбируется в мембраны слизистой оболочки тонкой кишки и/или подвергается быстрому химическим изменениям. Следовательно, могут возникать большие индивидуальные различия в биодоступности. Кроме того, синтетические эстрадиолы могут приводить к нежелательному накоплению определенных зенобиотиков и известно, что они проявляют канцерогенные свойства.

Также известно, что синтетические прогестины проявляют нежелательные побочные эффекты, включая, например, маскулинизацию и побочные действия на уровень холестерина, уровень триглицеридов и уровень липопротеинов высокой плотности. Синтетические прогестины также могут вызывать задержку жидкости и депрессию.

Дополнительным нежелательным побочным эффектом, который может поражать пациентов, получающих лечение синтетическими гормональными контрацептивами, является уменьшение/прекращение продукции натуральных гормонов. Многие пациенты также испытывают нежелательный дисбаланс гормонов, возникающий в результате прекращения овуляции из-за контрацептивного эффекта вводимых синтетических гормонов.

Соответственно, существует неотложная необходимость в фармацевтической композиции, которая включает эндогенные гормоны, которые могут вводиться в количествах, эффективных для обеспечения не только контрацептивного эффекта, но также заместительного гормонального эффекта.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает средства для введения натуральных гормонов с длительным периодом жизни в организм посредством депо-системы. Введение натуральных гормонов ускоряет эффект отрицательной обратной связи, при этом обеспечивая замещение ингибированных эндогенных гормонов.

Путем введения эффективных количеств эстрадиола, композиции по настоящему изобретению обеспечивают эффективную и надежную контрацепцию без нежелательных побочных эффектов, обычно ассоциированных с контрацептивами, рецептированными с перорально активными синтетическими гормонами. Кроме того, так как фармацевтические композиции составлены, чтобы обеспечивать профиль продолжительного растворения, гормоны имеют высокие средние продолжительности полужизни и избегают недостатков традиционного короткого периода полужизни натуральных гормонов. Между прочим, композиции по настоящему изобретению получены в соответствии со способами, описанными в патенте США № 5360616 и кристаллизованы в соответствии со способами, описанными в патенте США № 6528094 B1, оба из которых включены в настоящее описание в виде ссылки.

В частности, изобретение включает способ получения композиции эстрадиола с медленным высвобождением, включающий:

(a) получение частиц, состоящих из 17-β-эстрадиола и холестерина в соотношении 1:1 между 17-β-эстрадиолом и холестерином, где каждый из них находится в аморфной или полиморфной форме;

(b) воздействие атмосферы на указанные частицы из стадии (a) при относительной влажности 25% или менее в течение 24 ч;

(c) воздействие атмосферы, насыщенной ацетоном и водой, на указанные частицы из стадии (b) в течение 72 ч при 60°C;

(d) нагревание частиц из стадии (c) при 45°C в течение 42 ч, при этом скорость растворения 17-β-эстрадиола (СРЭ) из частиц, полученных на стадии (d), составляет менее чем 6% при измерении в водном растворе 0,3% мас./об. моноолеата полиоксиэтиленсорбитана (Tween80®) и очищенной согласно USP воде в течение 24 ч при 37°C и стандартном давлении.

Предпочтительно атмосфера ацетона/воды включает 72 мол.% ацетона и 28 мол.% воды.

В одном из вариантов осуществления изобретения 17-β-эстрадиол в полученных на стадии d) частицах представляет собой гемикристаллический 17-β-эстрадиол, который является на 55% аморфным и на 45% кристаллическим.

Кроме того, изобретение включает способ получения композиции эстрадиола с медленным высвобождением, включающий:

(a) получение частиц, состоящих из 17-β-эстрадиола и холестерина в соотношении 1:1 между 17-β-эстрадиолом и холестерином, где каждый из них находится в аморфной или полиморфной форме;

(b) воздействие атмосферы, насыщенной ацетоном и водой, на указанные частицы из стадии (a);

(c) повтор стадии (b);

(d) воздействие атмосферы, насыщенной этанолом и водой, на указанные частицы из стадии (c);

(e) нагревание частиц из стадии (d) при 45°C в течение 42 ч, при этом скорость растворения 17-β-эстрадиола (СРЭ) из частиц, полученных на стадии (e), составляет менее чем 20% при измерении в водном растворе 0,3% мас./об. моноолеата полиоксиэтиленсорбитана (Tween80®) и очищенной согласно USP воде в течение 24 ч при 37°C и стандартном давлении.

Предпочтительно смесь ацетона и воды включает 95 мол.% ацетона и 5 мол.% воды.

В другом варианте осуществления смесь этанола и воды включает 95 мол.% этанола и 5 мол.% воды.

Предпочтительно, где стадию (b) проводят в течение 24 ч и стадию (c) проводят дважды.

### Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - график среднего профиля эстрадиола в плазме, арифметическая шкала.

Фиг. 2 - график среднего профиля прогестерона в плазме, арифметическая шкала.

Фиг. 3A - рентгеновская дифрактограмма микросфер (40:60) эстрадиола-холестерина перед кристаллизацией.

Фиг. 3B - рентгеновская дифрактограмма микросфер (40:60) эстрадиола-холестерина после кристаллизации.

Фиг. 4 - профиль растворения микросфер (60:40) эстрадиола-холестерина после кристаллизации до твердого состояния в соответствии со способом по USPN 6528094 B1.

Фиг. 5 - сравнительный профиль растворения микросфер (1:1) эстрадиола-холестерина, полученных способом кристаллизации А (пример 2) и способом кристаллизации В (пример 3).

Фиг. 6 - ДСК микросфер (1:1) эстрадиола-холестерина, полученных в соответствии со способом В.

Фиг. 7 - сравнительные профили растворения микросфер эстрадиола (Е); и эстрадиола-холестерина (1:1), (1:2) и (1:3), как использованных в клиническом исследовании контрацептивов и полученных в соответствии со способом кристаллизации В.

Фиг. 8 - профиль эстрадиола в плазме, как функция времени для микросфер эстрадиола (Е); и эст-

радиола-холестерина (1:1), (1:2) и (1:3), полученных в соответствии со способом кристаллизации В.

Фиг. 9 - профиль эстрадиола в плазме, как функция времени, для микросфер эстрадиола (Е); и эстрадиола-холестерина (1:1), (1:2) и (1:3), доза эстрадиола 9 мг и прогестерона 400 мг; и полученных в соответствии со способом кристаллизации В.

Фиг. 10 - профиль прогестерона в плазме, как функция времени для микросфер эстрадиола (Е); и эстрадиола-холестерина (1:1), (1:2) и (1:3), доза эстрадиола 9 мг и прогестерона 400 мг; и полученных в соответствии со способом кристаллизации В.

Фиг. 11 - профиль ФСГ плазмы, как функция времени для микросфер эстрадиола-холестерина (1:1) и прогестерона, доза эстрадиола 9 мг и прогестерона 400 мг; и полученных в соответствии со способом кристаллизации В.

Фиг. 12 - профиль ФСГ в плазме, как функция времени для микросфер эстрадиола-холестерина (2:1) и прогестерона, доза эстрадиола 9 мг и прогестерона 400 мг; и полученных в соответствии со способом кристаллизации В по сравнению с эндогенным ФСГ.

Фиг. 13 - профиль лютеинизирующего гормона в плазме, как функция времени для микросфер эстрадиола-холестерина (1:1) и прогестерона, доза эстрадиола 9 мг и прогестерона 400 мг; и полученных в соответствии со способом кристаллизации В по сравнению с эндогенным ЛГ.

Фиг. 14 - профиль лютеинизирующего гормона в плазме, как функция времени для микросфер эстрадиола-холестерина (2:1) и прогестерона, доза эстрадиола 9 мг и прогестерона 400 мг; и полученных в соответствии со способом кристаллизации В по сравнению с эндогенным ЛГ.

Фиг. 15 - профиль эстрадиола в плазме, как функция времени для микросфер эстрадиола-холестерина (3:1) и прогестерона, и эстрадиола и прогестерона; доза эстрадиола 9 мг и прогестерона 400 мг; и полученных в соответствии со способом кристаллизации В по сравнению с эндогенным эстрадиолом.

Фиг. 16 - профиль эстрадиола в плазме, как функция времени для микросфер эстрадиола-холестерина (1:1) и прогестерона, и эстрадиола-холестерина (2:1) и прогестерона; доза эстрадиола 9 мг и прогестерона 400 мг; и полученных в соответствии со способом кристаллизации В по сравнению с эндогенным эстрадиолом.

Фиг. 17 - профиль прогестерона в плазме, как функция времени для микросфер эстрадиола и прогестерона, и эстрадиола-холестерина (3:1) и прогестерона; доза эстрадиола 9 мг и прогестерона 400 мг; и полученных в соответствии со способом кристаллизации В по сравнению с эндогенным прогестероном.

Фиг. 18 - профиль прогестерона в плазме, как функция времени для микросфер эстрадиола-холестерина (1:1) и прогестерона, и эстрадиола-холестерина (2:1) и прогестерона; доза эстрадиола 9 мг и прогестерона 400 мг; и полученных в соответствии со способом кристаллизации В по сравнению с эндогенным прогестероном.

Фиг. 19 - сравнительные профили растворения микросфер эстрадиола-холестерина (1:1), как полученных способами кристаллизации А, В и С.

Фиг. 20 - ДСК микросфер эстрадиола-холестерина (1:1), полученных в соответствии со способом С.

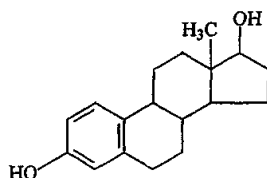
Фиг. 21 - рентгеновская дифрактограмма микросфер эстрадиола-холестерина (1:1), полученных в соответствии со способом С.

Фиг. 22 - рентгеновская дифрактограмма микросфер эстрадиола-холестерина (1:1), полученных в соответствии со способом С.

#### **Подробное описание предпочтительных вариантов воплощения изобретения**

В настоящем изобретении эффективное количество 17-β-эстрадиола вводят пациенту регулируемым образом, чтобы, по существу, минимизировать и/или устранить нежелательные побочные эффекты, обычно ассоциированные с контрацептивным лечением синтетическими гормонами.

Термин "17-β-эстрадиол", как используется в настоящем описании, охватывает любую фармацевтически приемлемую эстрогенно-активную форму 17-β-эстрадиола, т.е. эстра-1,3,5(10)-триен-3,17-β-диол, который имеет формулу



или один из его эфиров. 17-β-эстрадиол может быть получен из естественных источников или произведен синтетически. Подходящие эфиры 17-β-эстрадиола для целей настоящего изобретения включают, например, 3-моноэфиры, такие как эстрадиолбензоат или эстрадиол-3-ацетат; 17-моноэфиры, такие как эстрадиолципонат, эстрадиол-17-пропионат, эстрадиол-17-ацетат, эстрадиол-17-гептаноат (эстрадиолэнантат), эстрадиол-17-ундеканоат (эстрадиол ундецилат) и эстрадиол-17-валерат; 3,17-диэфиры, такие как эстрадиол дипропионат и эстрадиол диацетат и подобные и их комбинации.

Кроме того, микросферы согласно каждому варианту воплощения изобретения могут включать до-

полнительные эндогенные стероиды, такие как холестерин.

Дополнительные эндогенные стероиды являются предпочтительно инертными по отношению к эстрогеновым агентам и имеют в основном пониженную растворимость в биологических жидкостях, таких как кровь. При таком рецептировании микросферы холестерина/эстрогена составлены таким образом, что эстрогеновые агенты однородно распределены по всему относительно инертному стероиду, так что растворение таких агентов замедлено, но, несмотря на это, является непрерывным и по существу равномерным. Предпочтительно инертный стероид, а также эстроген, находятся в кристаллической форме в микросфере. Как обсуждается более подробно ниже, по существу, равномерная скорость растворения активных агентов таким образом облегчает регулируемое высвобождение активных агентов в течение продолжительного периода. Предпочтительно продолжительным периодом является по меньшей мере один менструальный цикл, и в случае человека женского пола, составляет по меньшей мере около 4 недели.

В вариантах воплощения изобретения, в количестве, эффективном для контрацептивного и гормонозаместительного действия E2 являются количества, которые подходят для обеспечения одновременно контрацептивного и гормонозаместительного эффекта. В частности, в отношении контрацептивного эффекта, эффективным количеством E2 является количество, которое достаточно для действия на гипоталамус и гипофиз пациента, получающего лечение, для ингибирования высвобождения гонадотропных гормонов, необходимых для поддержания нормальной функции яичников.

Кроме того, количеством, эффективным для гормонозаместительного действия E2, является количество, достаточное для преимущественного замещения естественного поступления тех гормонов, чья эндогенная продукция снижена и/или исключена с прекращением овуляции.

В предпочтительных вариантах воплощения изобретения количествами, эффективными для контрацептивного и гормонозаместительного действия E2, являются такие количества, которые подходят для достижения желаемого эффекта у человека женского пола, и, на основании стандартной дозы, составляющей от приблизительно 5 мг до приблизительно 15 мг эстрадиола. Более предпочтительные варианты воплощения изобретения включают приблизительно 9 мг 17- $\beta$ -эстрадиола.

Композиция по настоящему изобретению включает содержащие гормоны микросферы для обеспечения регулируемого, предсказуемого и воспроизводимого введения гормонов, содержащихся в них. Различные физико-химические характеристики микросфер являются важными для достижения регулируемого высвобождения гормонов. В частности, растворимость, размер и полиморфная композиция микросфер имеют существенное влияние на скорость высвобождения. Например, чем больше диаметр микросферы, тем дольше уровень гормона имеет неопределяемые значения. В настоящем изобретении диаметр микросфер составляет предпочтительно от приблизительно 25 мкм до приблизительно 125 мкм, более предпочтительно от приблизительно 35 мкм до приблизительно 105 мкм и наиболее предпочтительно от приблизительно 35 мкм до приблизительно 75 мкм.

Так как известно, что натуральный E2 метаболически разлагается при введении перорально, композицию по настоящему изобретению предпочтительно вводят субъектам парентерально, особенно посредством внутримышечной инъекции. Задачей способов по настоящему изобретению является обеспечить контрацептивный эффект при этом одновременно обеспечивая гормонозаместительный эффект поддержанием натуральных уровней E2. Кроме того, фармацевтические композиции и способы по настоящему изобретению способствуют установлению ежемесячных менструальных циклов свойственных здоровому организму, продолжительностью приблизительно 28 дней  $\pm$  3 дня. В предпочтительных вариантах воплощения, композиции по настоящему изобретению вводят субъекту посредством инъекции ежемесячно с использованием подходящих средств для инъекции, таких как, например, игла для внутрикожных инъекций 18 или 20 размера.

Предпочтительные фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают количества эстрогена, эффективные для контрацептивного и гормонозаместительного действия, составленные в композиции с продолжительным или замедленным высвобождением. Такие композиции с замедленным высвобождением могут включать эстроген, рецептированный с носителем, вспомогательным веществом или вяжущим веществом, имеющим сниженную растворимость в биологических жидкостях в месте введения. Например, такие композиции с замедленным высвобождением могут включать микросферы, где эстроген рецептирован с естественным стероидом, таким как холестерин в микросфере. Холестерин имеет преимущественно меньшую растворимость в биологических жидкостях, таких как кровь, по сравнению с эстрогенами и прогестинами и, следовательно, уменьшает растворение таких активных агентов и таким образом задерживает высвобождение таких активных агентов в кровоток.

Дополнительная информация, которая может быть инструкцией в получении таких композиции микросфер с отложенным высвобождением, обнаруживается в патентах США № 5360616; 5512303; 5633014; 5643604 и 6287693, каждый из которых включен в настоящее описание в виде ссылки.

По меньшей мере в одном предпочтительном варианте воплощения изобретения композицию с замедленным высвобождением по настоящему изобретению получают смешиванием эстрогена тщательно и гомогенно со всем холестериновым носителем. Смесь эстрогена/холестерина может быть заморожена

расплавленной и/или экструдирована, или иным образом преобразована во множество частиц желаемого размера и формы и подвергнута кристаллизации твердого состояния, как описано в патенте США № 6287693. В патенте '693 раскрыт процесс кристаллизации твердого состояния, таким образом композиция из смешанных структур преобразуется в частицы желаемого размера и формы, и последовательно кристаллизуется в наиболее стабильный полиморф каждого из соответствующих элементов без потери характеристик размера/формы частиц, воздействием на частицы окружающей среды, имеющей высокую атмосферную концентрацию одного или более растворителей. Полученные формованные кристаллические частицы были стабильными при хранении, так что они могут быть упакованы и храниться в виде сухого твердого вещества или порошка или в виде суспензии в водном носителе в течение продолжительных периодов времени (например, по меньшей мере один месяц) без потери желаемых характеристик размера/формы. Так как процесс кристаллизации твердого состояния дает высокую чистоту и стабильность, частицы по настоящему изобретению могут быть сделаны с или без дополнительных вспомогательных веществ, буферов, стабилизаторов, консервантов и биоцидов.

Способность создавать частицы желаемого размера и формы является особенно преимущественной, так как она обеспечивает средство для получения согласующихся или даже однородных размеров и формы частиц, которые в свою очередь обеспечивают простоту введения (например, посредством шприца для подкожных инъекций) и регулируемое и предсказуемое растворение и высвобождение активного агента(ов). В особенно предпочтительных вариантах воплощения, частицы являются микросферами.

Композиция по настоящему изобретению может вводиться любым обычным путем введения. Предпочтительным путем введения является парентеральное введение и более предпочтительным путем является внутримышечная (в/м) инъекция. При введении парентеральным введением, является предпочтительным, чтобы композиция была составлена в виде жидкости, или в растворе или в виде смеси, такой как суспензия. Предпочтительно композиция включает микросферы, обсуждаемые выше, в виде суспензии в водном носителе.

Необязательно, композиция может быть составлена в виде порошка для последующего смешивания с носителем и введения. В таких вариантах воплощения изобретения фармацевтическая композиция может быть упакована и продана, как часть набора. Такой набор может включать одну или множество доз: (1) порошка, включающего активные агенты в комбинации с вспомогательными веществами, добавками, буферами, консервантами и подобными; (2) одно- или многодозовые количества жидкого носителя, необязательно включающего буферы, консерванты и/или биоциды; и (3) устройство для инъекций, такое как шприц для подкожного введения, предпочтительно шприц размера 18 или 20.

Еще одним вариантом для введения композиций по настоящему изобретению является трансдермальная доставка. Трансдермальная доставка лекарственных средств может быть достигнута различными средствами, включая инъекцию порошка биолистическим методом, где частицы ускоряют газом или другими средствами для прохождения через кожу. Пример такого подхода описан в патентах США № 6168587, названном "Needleless syringe using supersonic gas flow for particle delivery" ("Безыгольный шприц с использованием сверхзвукового тока газа для доставки частиц"); и 6475181, названном "Drug particle delivery" ("Доставка частиц лекарственного средства"), оба из которых включены в настоящее описание в виде ссылки.

Подобная трансдермальная доставка может быть достигнута более пассивно посредством клейких пластырей, наносимых на кожу на продолжительные периоды времени. Таким пластыри описаны в, например, патенте США № 6149935, названном "Solid matrix system for transdermal drug delivery" ("Твердые матричные системы для трансдермальной доставки лекарственных средств"), включенном в настоящее описание в виде ссылки.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут эффективно вводиться в любой организм млекопитающего, такого как организм примата, собаки, кошки, овцы, лошади, свиньи, коровы или мыши. Предпочтительно субъектом является организм примата и еще более предпочтительно - человек женского пола. Необходимо понимать, что определенный эстроген и прогестин, используемые в композициях для различных млекопитающих, могут варьироваться, как и количества.

Композиция, содержащая микросферы по настоящему изобретению может быть получена с использованием любого подходящего метода. В одном из предпочтительных вариантов воплощения изобретения микросферы получают нагреванием E2 и затем быстрым охлаждением, так что микросферы становятся достаточно кристаллизованными. После кристаллизации капсулы могут быть собраны фильтрацией на основании размера частиц.

Обычно микросферы большего размера уменьшают максимальную концентрацию гормонов и время, требуемое для достижения такой концентрации. Кроме того, микросферы большего размера увеличивают время полужизни абсорбции гормона.

В соответствии со следующим аспектом изобретения, обеспечивают набор для применения в контрацептивной/гормонозаместительной терапии. Набор может включать фармацевтическую композицию по изобретению, которая включает 17-β-эстрадиол в количестве, эффективном для контрацепции и гормонозаместительного действия. Набор может также включать один или более дополнительных компонентов, таких как стерильная ампула, включающая водный растворитель для восстановления компози-

ции в гомогенную суспензию, если композиции представлены в микросферах в форме стерильного порошка. Кроме того, набор может включать средства для введения композиции, такие как, например, шприцы с размером иглы 18 и/или 20 для внутримышечной инъекции.

Предусматривается, что композиции по настоящему изобретению могут быть рецептированы и вводиться в соответствии со следующим протоколом. Композицию микросфер, включающих 9 мг E2 получают в виде стерильного порошка, где микросферы варьируются в размере от приблизительно 35 мкм до приблизительно 75 мкм, предпочтительно от приблизительно 39 мкм до приблизительно 52 мкм. В определенных предпочтительных вариантах воплощения изобретения порошок упакован сухим в однократные шприцы. Предпочтительными являются шприцы с иглами размером от около 18 до 20 для внутримышечной инъекции. Шприцы предпочтительно упакованы в герметичные, стерильные упаковки и хранятся в условиях окружающей среды от около 15°К до около 30°К.

Заранее упакованная композиция порошка может быть суспендирована в водном носителе. В предпочтительном варианте воплощения изобретения водный носитель можно получать из стерильной ампулы, содержащей 3,0 мл водного носителя. Предпочтительный водный носитель, применяемый для суспендирования микросфер, состоит из:

Метилпарабен NF	4,11 мг
Пропилпарабен NF	0,45 мг
Маннит NF	144 мг
Карбоксиметилцеллюлоза натрия, USP, низкая вязкость	2,25 мг
Полисорбат 80 NF	0,60 мг
Вода для инъекций USP	3,00 мг

Обычный специалист в области техники должен понимать, что композиция и относительные концентрации таковой в водном носителе не являются решающими для настоящего изобретения, и следовательно, все могут варьироваться без существенного изменения или уменьшения преимуществ или применимости настоящего изобретения.

Восстановление может быть достигнуто тщательным перемешиванием пока не получают однородную суспензию. Полученную суспензию предпочтительно вводят глубокой внутримышечной инъекцией, например, в область ягодицы. Первую дозу необходимо давать в первые пять дней от начала последней менструации. Последующие дозы необходимо давать с расписанием каждые 28 ± 3 дня. Для простоты и удобства последующие дозы можно поочередно вводить в ягодичные области.

Альтернативно, фармацевтические композиции прогестерона/эстрадиола по настоящему изобретению могут быть составлены для получения композиций эстрадиола замедленного высвобождения.

Фармацевтическая композиция, включающая микросферы прогестерона и микросферы эстрадиола и холестерина, дает надежный контрацептивный эффект. См. пример 1, тестируемое соединение В, ниже. Признанным недостатком парентеральных контрацептивных композиций, содержащих эстрадиол, является их высокая растворимость в водных растворах. Микросферы, содержащие эстрадиол, могут быть рецептированы обработкой после изготовления или закаливанием микросфер. Т.е. микросферы сначала преобразуют в желаемый размер и форму, подвергают стадии обработки или закаливания в регулируемой атмосфере и затем сушат и/или восстанавливают. В зависимости от обработки, ЭК микросферы имеют степень растворения эстрадиола в водном растворе в течение 24 ч приблизительно 20% или менее и предпочтительно приблизительно 15% или менее. Более предпочтительные варианты воплощения изобретения дают степень растворения приблизительно 10% или менее, еще более предпочтительными являются таковые, имеющие степень растворения эстрадиола приблизительно 6% или менее.

Скорость растворения эстрадиола (СРЭ (EDR)) представляет собой меру количества эстрадиола, растворенного в водном растворе 0,3% мас./об. моноолеата полиоксиэтиленсорбитана (Tween80®) и очищенной USP воде в течение 24 ч при 37°С и стандартном давлении.

Продукция частиц, имеющих низкую СРЭ, облегчает получение фармацевтической композиции для гормонозаместительной терапии (ГЗТ), содержащей очень низкую концентрацию эстрадиола. Такие композиции с низкой концентрацией эстрадиола хорошо подходят пациентам, нуждающимся в ГЗТ во время первых пяти лет менопаузы. Кроме того, композиции, имеющие низкую СРЭ, облегчают схему лечения, включая меньше, или с меньшей частотой, курсы введения. Предусматривается, что композиции по настоящему изобретению могут вводиться так редко, как ежемесячно или один раз в два месяца.

Рентгеноструктурные исследования частиц, демонстрирующие такие низкие скорости растворения эстрадиола, позволяют предположить, что частицы представляют собой молекулярные агрегаты с полукристаллической композицией, включающие и аморфный, и кристаллический компонент. Композициями с низкой СРЭ являются таковые, где эстрадиол состоит из от приблизительно 45% до приблизительно 65% аморфного компонента и от приблизительно 35% до приблизительно 55% кристаллического компонента. Предпочтительно частицы имеют приблизительно 50-60% аморфного компонента и приблизи-



тельно 40-50% кристаллического компонента. Более предпочтительно частицы имеют приблизительно 55% аморфного компонента и приблизительно 45% кристаллического компонента. Такие композиции с низкими СРЭ предпочтительно рецептированы из смеси молярного отношения 1:1 эстрадиола:холестерина.

Без желания быть привязанными к какой-либо теории или научному принципу, авторы считают, что сниженная растворимость и более низкий профиль растворения относится на счет ориентации аморфного компонента и кристаллического компонента в молекулярном агрегате или молекулярной структуре. То есть, предусматривается, что наружная поверхность частицы состоит преимущественно из аморфного компонента, так что молекулы эстрадиола определяют преимущественно гидрофобную часть молекулы по отношению к растворителю, таким образом делая частицы преимущественно нерастворимыми в воде.

Частицы эстрадиола с медленным высвобождением могут быть рецептированы составлением эстрадиола и холестерина в молярном соотношении 1:1, переработкой композиции в частицы желаемого размера и формы и подвергания их воздействию атмосферы, обогащенной растворителем в течение продолжительного периода времени при повышенной температуре и последовательно, сушки частиц при повышенной температуре. В одном варианте воплощения изобретения, изготовленные частицы подвергают воздействию атмосферы при низкой относительной влажности (ОВ) в течение около 12 ч или более перед воздействием атмосферы, насыщенной растворителем. Предпочтительно частицы рецептируют как микросферы.

Микросферы, имеющие СРЭ около 155 или менее, могут быть рецептированы посредством создания частиц, состоящих из преимущественно молярного соотношения 1:1 эстрадиола и холестерина, где каждый из них или оба находятся в аморфной или полиморфной форме; проведение воздействия атмосферы на частицы при относительной влажности приблизительно 25% или менее в течение по меньшей мере приблизительно 12 ч; проведение воздействия атмосферы, насыщенной ацетоном и водой, на частицы в течение по меньшей мере приблизительно 48 ч при от приблизительно 50°C до приблизительно 65°C; сушки частиц при от приблизительно 35°C до приблизительно 50°C в течение приблизительно 24 ч или более; и восстановления указанных частиц; где СРЭ восстановленных части составляет менее чем приблизительно 15% (по массе) в течение 24 ч.

Более предпочтительно, способ включает создание частиц, состоящих преимущественно из эстрадиола и холестерина, где каждый из них или оба присутствуют в аморфной или полиморфной форме; проведение воздействия атмосферы с низкой ОВ на указанные частицы в течение приблизительно 24 ч; проведение воздействия атмосферы, насыщенной ацетоном и водой, на частицы в течение приблизительно 72 ч при приблизительно 60°C; сушка частиц при от приблизительно 45°C в течение приблизительно 42 ч; и восстановление указанных частиц, где скорость растворения эстрадиола из восстановленных частиц в водном растворе составляет менее чем приблизительно 6% (по массе) в течение 24 ч.

Относительные концентрации ацетона и воды, насыщающие атмосферу, составляют от приблизительно 65 мол.% до приблизительно 80 мол.% и от приблизительно 20 мол.% до приблизительно 35 мол.% соответственно. Предпочтительно относительные концентрации составляют от приблизительно 70 мол.% до приблизительно 75 мол.% ацетона; и от приблизительно 25 мол.% до приблизительно 30 мол.% воды. Наиболее предпочтительно, концентрации двух компонентов составляют приблизительно 72 мол.% ацетона до приблизительно 28 мол.% воды. Низкая относительная влажность окружающей среды составляет приблизительно 25% ОВ или менее; и предпочтительно приблизительно 20% или менее.

Альтернативно, частицы, имеющие СРЭ приблизительно 20% или менее, могут быть рецептированы периодическим воздействием атмосферы, содержащей ацетон/воду, и атмосферы, содержащей этанол/воду. Такой способ включает: (а) создание частиц, состоящих преимущественно из эстрадиола и холестерина в молярном соотношении около 1:1, где каждый или оба находятся в аморфной или полиморфной форме; (b) проведение воздействия атмосферы, насыщенной ацетоном и водой, на указанные частицы; (с) повторение стадии (b) по меньшей мере один раз, и предпочтительно дважды; (d) проведение воздействия атмосферы, насыщенной этанолом и водой, на указанные частицы; (е) сушка частиц; и (f) восстановление указанных частиц; где скорость растворения эстрадиола из восстановленных частиц в водном растворе составляет менее чем приблизительно 20% (по массе) в течение 24 ч.

В предпочтительных вариантах воплощения изобретения частицы подвергают воздействию паров смеси ацетона/воды в течение от около двух до около пяти последующих стадий продолжительностью по меньшей мере приблизительно 12 ч при приблизительно 20-40°C. Предпочтительно стадию ацетона/воды проводят в трех последовательных стадиях в течение приблизительно 24 ч при приблизительно 30°C.

Относительная концентрация смеси ацетон/вода составляет как описано выше; и смесь этанол/вода имеет относительную концентрацию от приблизительно 95 мол.% до приблизительно 99 мол.% этанола; и от приблизительно 5 мол.% до приблизительно 1 мол.% воды. Частицы могут быть высушены при от приблизительно 40°C до приблизительно 50°C, предпочтительно приблизительно 45°C в течение около 24 ч или более, и предпочтительно приблизительно 36 ч. Стадии сушки, описанные здесь и выше, могут проводиться в вакууме или в воздухе.

Более предпочтительно, альтернативный способ включает: создание частиц, состоящих преимущественно из эстрадиола и холестерина в молярном соотношении около 1:1, где каждый из них или оба на-

ходятся в аморфной или полиморфной форме; проведение воздействия атмосферы, насыщенного ацетоном и водой, при приблизительно 30°C на указанные частицы в течение трех последовательных стадий в течение около 24 ч; проведение воздействия атмосферы, насыщенного этанолом и водой, на указанные частицы в течение около 2 ч при приблизительно 30°C; сушка частиц при приблизительно 45°C в течение приблизительно 42 ч; и восстановление указанных частиц, где степень растворения эстрадиола из восстановленных частиц в водном растворе меньше, чем приблизительно 20% (по массе) в течение 24 ч.

Способы по настоящему изобретению включают средства для изготовления микросфер эстрадиола и холестерина, имеющих СРЭ менее чем приблизительно 20% (по массе). Предпочтительные варианты воплощения имеют СРЭ приблизительно 15% или менее и, более предпочтительно, приблизительно 6% или менее. Эстрадиол микросфер по настоящему изобретению находится в гемикристаллической или композитной форме, где приблизительно 50-60% является аморфным и приблизительно 40-50% является кристаллическим. Предпочтительными вариантами воплощения являются таковые, где эстрадиол на приблизительно 55% является аморфным и приблизительно 45% является кристаллическим.

Композиции могут кроме того включать добавки и вспомогательные вещества, такие как смазывающие вещества, буферы, стабилизаторы и подобные. Кроме того, частицы могут быть суспендированы в носителе для парентерального введения. Такие композиции имеют контрацептивный эффект и могут быть использованы эффективно в схемах гормонального замещения, используя парентеральное введение один раз в месяц или даже через месяц. Предпочтительно композицию вводят внутримышечной инъекцией.

Без дальнейшего описания считают, что обычный специалист в области техники может, с использованием предшествующего описания и следующих иллюстративных примеров, создать и применять композиции по настоящему изобретению и осуществлять заявленные способы. Следующие рабочие примеры, следовательно, иллюстрируют предпочтительные варианты воплощения изобретения и способы для получения и использования настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом остальное описание.

#### Пример 1.

Фармакокинетическое исследование у кроликов для оценки биодоступности различных комбинаций микросфер прогестерона и микросфер эстрадиола и микросфер при различных соотношениях эстрадиола к холестерину.

Настоящее исследование имеет целью оценить фармакокинетический профиль тестируемых продуктов, содержащих прогестерон (Р) и 17-β-эстрадиол (Е). Проспективное и сравнительное исследование проводили на самцах кроликов New Zealand. Тестируемые продукты составляли из водных суспензий с использованием водного растворителя, описанного выше, микросфер прогестерона + микросфер эстрадиола (Е) или эстрадиола холестерина (ЕС), полученных следующим способом, описанным в патенте США № 5360616 и кристаллизованных в соответствии с патентом США № 6528094 В1. Оцениваемые тестируемые продукты были следующими:

Тестируемый продукт	Композиция
A	Р микросферы (МЕ) + Е МЕ
B	Р МЕ + (1:1) эстрадиол холестерин МЕ
C	Р МЕ + (2:1) эстрадиол холестерин МЕ
D	Р МЕ + (3:1) эстрадиол холестерин МЕ

Водные суспензии вводили в форме внутримышечных (в/м) инъекций. Каждый кролик получал 133 мг прогестерона и 3 мг эстрадиола. Образцы крови собирали в момент времени С (перед дозированием), через 1, 2, 4 и 9 ч и каждый день со дня 2 по 14 и через день с дня 14 по 28. Полученные образцы оценивали в отношении прогестерона и эстрадиола радиоиммуноанализом (РИА).

Из профилей в плазме рассчитывали следующие фармакокинетические параметры: площадь под кривой до бесконечности (AUC\_INF), площадь под кривой до последнего времени взятия образца (AUC\_t), максимальная концентрация в плазме (C<sub>max</sub>), время до достижения C<sub>max</sub> (T<sub>max</sub>), время полужизни (t<sub>2</sub>), константа элиминации (K<sub>e</sub>) и среднее время нахождения (MRT). Такие результаты анализировали статистически с целью оценки любой возможной разницы между группами.

В отношении сравнения параметров, рассчитанных для эстрадиола, хотя анализ не показал свидетельств каких-либо возможных статистически значимых различий (p < 0,05) в этих параметрах между группами, как показано в следующей таблице, существуют различия в MRT между группами, так как MRT для (1:1) ЕС МЕ (исследуемый продукт В) было почти в два раза длиннее, чем для микросфер Е (исследуемый продукт А), как показано в следующей таблице.

	Исследуемый продукт			
	A	B	C	D
MRT (дни)	4,56 $\forall$ 1,05	8,33 $\forall$ 2,61	5,01 $\forall$ 0,55	6,40 $\forall$ 2,27
CV	23,3	31,3	11	35,5
n	4	4	4	4

Относительно сравнения параметров, рассчитанных для прогестерона, хотя наблюдали вариabельность в рассчитанных параметрах, не было обнаружено статистически значимой разницы ( $p < 0,05$ ) между группами.

Графический анализ.

Оцениваемые средние профили в плазме для эстрадиола и прогестерона для четырех тестируемых продуктов показаны на фиг. 1 и 2. В соответствии с результатами для эстрадиола и прогестерона, хотя статистический анализ не показал свидетельств различий между группами, графический анализ профилей в плазме (см. фиг. 1) показал различное поведение. Это может быть из-за небольшого размера образца.

Пример 2 (сравнительный).

Микросферы смеси 49% 17- $\beta$ -эстрадиола и 51% холестерина.

Этот сравнительный пример является аналогичным изготовлению частиц в соответствии с примером 7 патента США № 6528094 B1, который включен в настоящее описание в виде ссылки (также называемый в настоящем описании как "способ кристаллизации A"). Микросферы эстрадиола/холестерина могут быть смешаны с микросферами прогестерона для получения фармацевтической композиции исследуемого продукта B примера 1, выше.

Микросферы такой смеси получали плавлением вместе компонентов и, как для чистых веществ, распылением в капельки и замораживанием в микросферы. Микросферы исходно показывали высокое аморфное содержание.

Когда микросферы помещали в резервуар приблизительно 7 литров и подвергали воздействию в течение 24 ч при 30°C, парам 8 мл этанола, содержащихся в пористом целлюлозном материале, исходные аморфные микросферы кристаллизовались полностью в присутствии паров.

Микросферы сушили при 60°C в вакууме в течение 24 ч и остаточный этанол, присутствующий в микросферах, был менее чем 0,01%.

Для оценки стабильности микросфер, некристаллизованные микросферы (только замороженные расплавленные) и микросферы в соответствии с настоящим изобретением отдельно помещали в водный раствор при 40°C и наблюдали оптической микроскопией после 82 дней. Как наблюдали оптической микроскопией, микросферы кристаллизованные в соответствии с настоящим изобретением, оставались стабильными в течение периода времени при помещении в воду, тогда как некристаллизованные микросферы нет.

Полученные кристаллизованные микросферы были морфологически стабильны в течение 82 дней при помещении в раствор 0,01% Полисорбата 80 в воде, очищенной USP при 40°C или в течение 14 дней, когда их вводили внутримышечно кроликам.

Фиг. 3 показывает рентгеновскую дифрактограмму микросфер ЕС (40:60) перед и после кристаллизации; и фиг. 4 показывает соответствующий профиль растворения (т.е. 74% эстрадиола растворяется через 24 ч в водном растворе 0,3% Tween 80®).

Пример 3.

Модифицированный способ кристаллизации для ЕС МЕ, представляющих 20% растворение в течение 24 ч ("способ кристаллизации B").

Микросферы эстрадиола-холестерина (1:1) получали, как в примере 2 выше. Микросферы, имеющие высокое аморфное содержание подвергали воздействию паров ацетона и воды (95 мол.% ацетона: 5 мол.% воды) в течение трех последовательных 24-часовых стадий при 30°C). Между стадиями, герметичные контейнеры открывали и содержимое сушили воздухом, остаточный растворитель удаляли и затем микросферы эстрадиола представляли на следующую стадию воздействия пара.

Затем частицы нагревали (обезвоживали) при 45°C в течение 42 ч в вакууме (около 12,2 мм рт. ст.).

Полученные частицы давали среднюю СРЭ около 20%. См. фиг. 5.

Пример 4.

Способ кристаллизации для сверхнизкого растворения микросфер эстрадиола-холестерина (способ кристаллизации C).

Микросферы эстрадиола-холестерина изготавливали в соответствии со способом по примеру 2. Частицы хранили при низкой относительной влажности в течение 24 ч. Частицы затем подвергали воздействию паров ацетона и воды (72 мол.% ацетона/28 мол.% воды) в течение 72 ч при 60°C. Частицы затем нагревали (для обезвоживания) при 45°C в течение 42 ч.

Полученные частицы имели в среднем приблизительно 5% растворения эстрадиола в течение 24 ч в водном растворе 0,3% моноолеата полиоксиэтиленсорбитана (Tween 80®) при стандартной температуре

и давлении.

Фиг. 19 иллюстрирует профиль растворения частиц настоящего примера по сравнению с таковым, полученным из способов примеров 2 и 3.

Фиг. 20 показывает ДСК профиль частиц, полученный из этого примера.

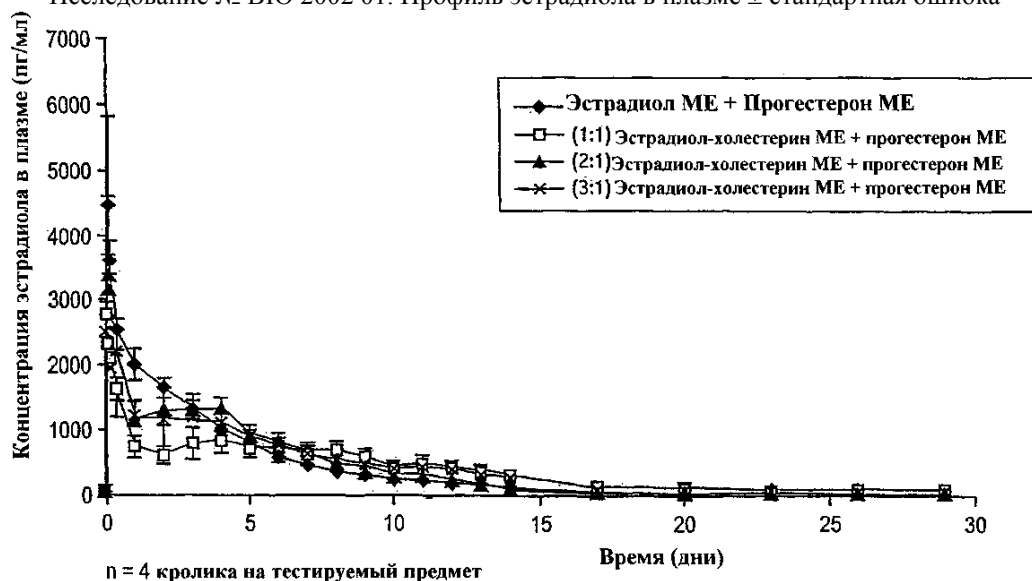
Фиг. 21 и 22 представляют собой рентгеновские дифрактограммы частиц, полученных из примера 4.

Тогда как настоящее изобретение было описано со ссылкой на специфические варианты воплощения изобретения, настоящее изобретение предназначено для охватывания различных изменений и замещений, которые могут быть сделаны обычным специалистом в области техники без отклонения от тенденции и рамок приложенной формы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

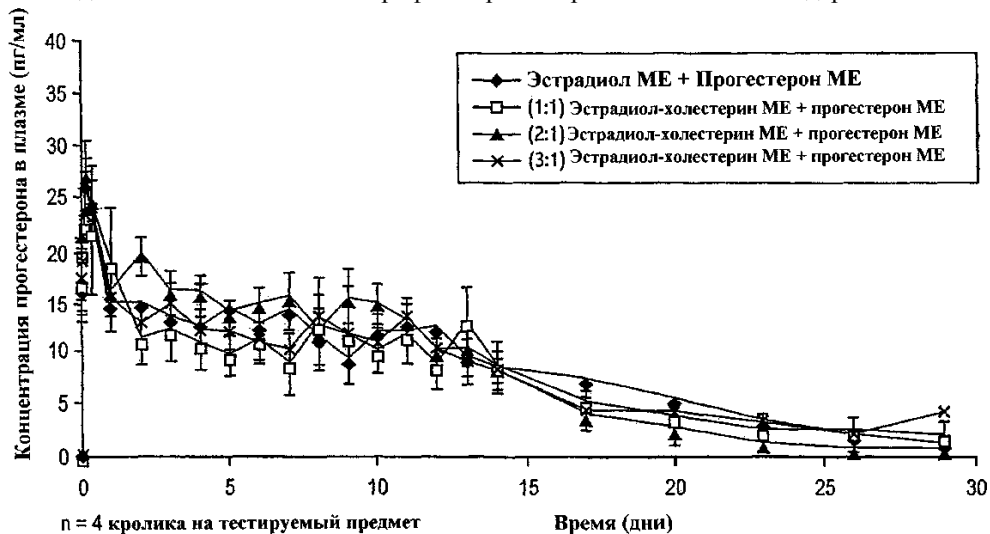
1. Способ получения композиции эстрадиола с медленным высвобождением, включающий:
  - (a) получение частиц, состоящих из 17-β-эстрадиола и холестерина в соотношении 1:1 между 17-β-эстрадиолом и холестерином, где каждый из них находится в аморфной или полиморфной форме;
  - (b) воздействие атмосферы на указанные частицы из стадии (a) при относительной влажности 25% или менее в течение 24 ч;
  - (c) воздействие атмосферы, насыщенной ацетоном и водой, на указанные частицы из стадии (b) в течение 72 ч при 60°C;
  - (d) нагревание частиц из стадии (c) при 45°C в течение 42 ч, при этом скорость растворения 17-β-эстрадиола (СРЭ) из частиц, полученных на стадии (d), составляет менее чем 6% при измерении в водном растворе 0,3% мас./об. моноолеата полиоксиэтиленсорбитана (Tween80®) и очищенной согласно USP воде в течение 24 ч при 37°C и стандартном давлении.
2. Способ по п.1, где атмосфера ацетона/воды включает 72 мол.% ацетона и 28 мол.% воды.
3. Способ по п.1, где 17-β-эстрадиол в полученных на стадии (d) частицах представляет собой гемикристаллический 17-β-эстрадиол, который является на 55% аморфным и на 45% кристаллическим.
4. Способ получения композиции эстрадиола с медленным высвобождением, включающий:
  - (a) получение частиц, состоящих из 17-β-эстрадиола и холестерина в соотношении 1:1 между 17-β-эстрадиолом и холестерином, где каждый из них находится в аморфной или полиморфной форме;
  - (b) воздействие атмосферы, насыщенной ацетоном и водой, на указанные частицы из стадии (a);
  - (c) повтор стадии (b);
  - (d) воздействие атмосферы, насыщенной этанолом и водой, на указанные частицы из стадии (c);
  - (e) нагревание частиц из стадии (d) при 45°C в течение 42 ч,
 при этом скорость растворения 17-β-эстрадиола (СРЭ) из частиц, полученных на стадии (e), составляет менее чем 20% при измерении в водном растворе 0,3% мас./об. моноолеата полиоксиэтиленсорбитана (Tween80®) и очищенной согласно USP воде в течение 24 ч при 37°C и стандартном давлении.
5. Способ по п.4, где смесь ацетона и воды включает 95 мол.% ацетона и 5 мол.% воды.
6. Способ по п.4, где смесь этанола и воды включает 95 мол.% этанола и 5 мол.% воды.
7. Способ по п.4, где стадию (b) проводят в течение 24 ч и стадию (c) проводят дважды.

Средний профиль эстрадиола в плазме. Арифметическая шкала.  
Исследование № ВЮ 2002 01. Профиль эстрадиола в плазме  $\pm$  стандартная ошибка



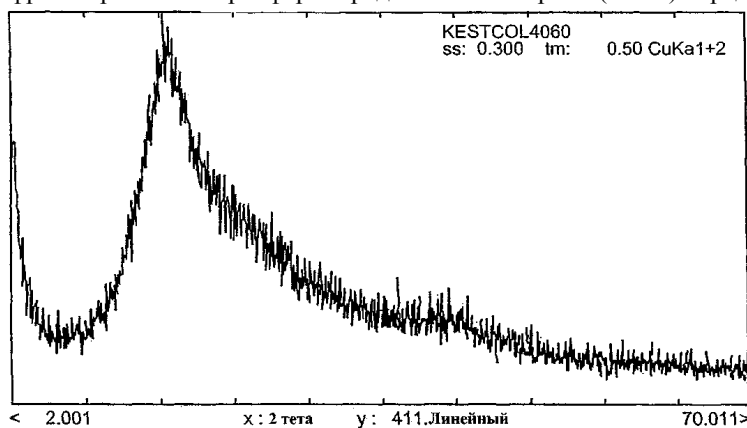
Фиг. 1

Средний профиль прогестерона в плазме. Арифметическая шкала.  
Исследование № ВЮ 2002 01. Профиль прогестерона в плазме  $\pm$  стандартная ошибка



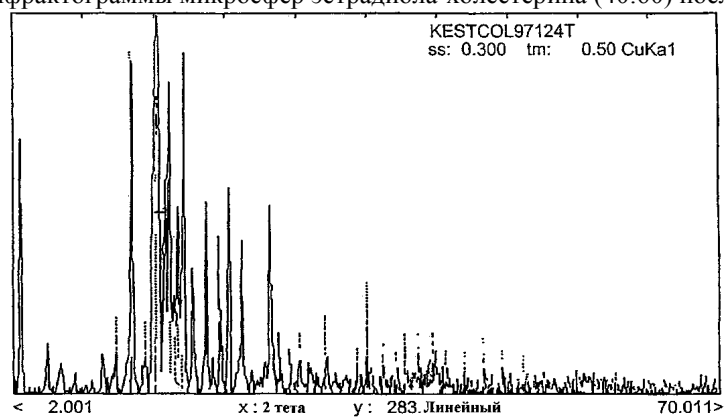
Фиг. 2

Рентгеновские дифрактограммы микросфер эстрадиола-холестерина (40:60) перед кристаллизацией



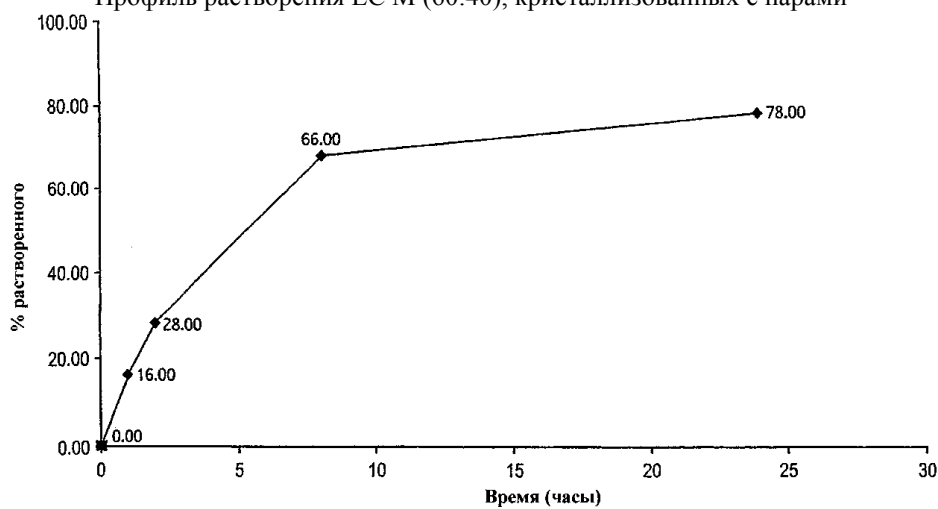
Фиг. 3А

Рентгеновские дифрактограммы микросфер эстрадиола-холестерина (40:60) после кристаллизации



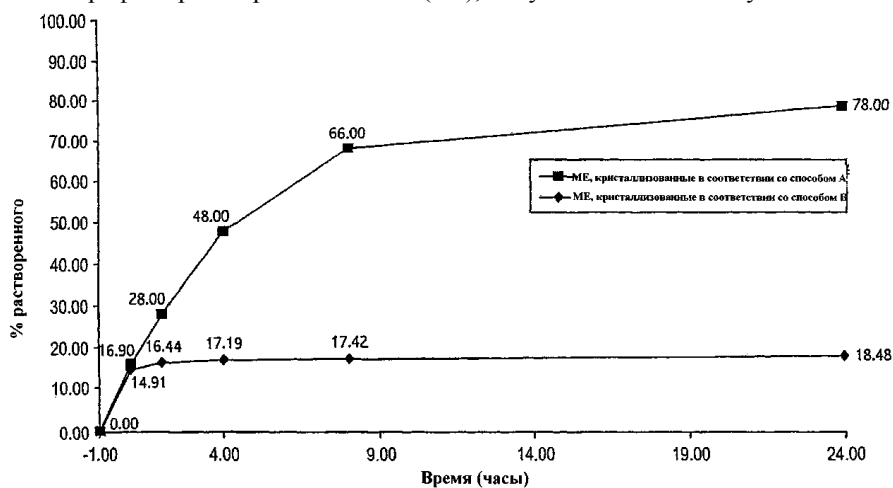
Фиг. 3В

Профиль растворения ЕС М (60:40), кристаллизованных с парами



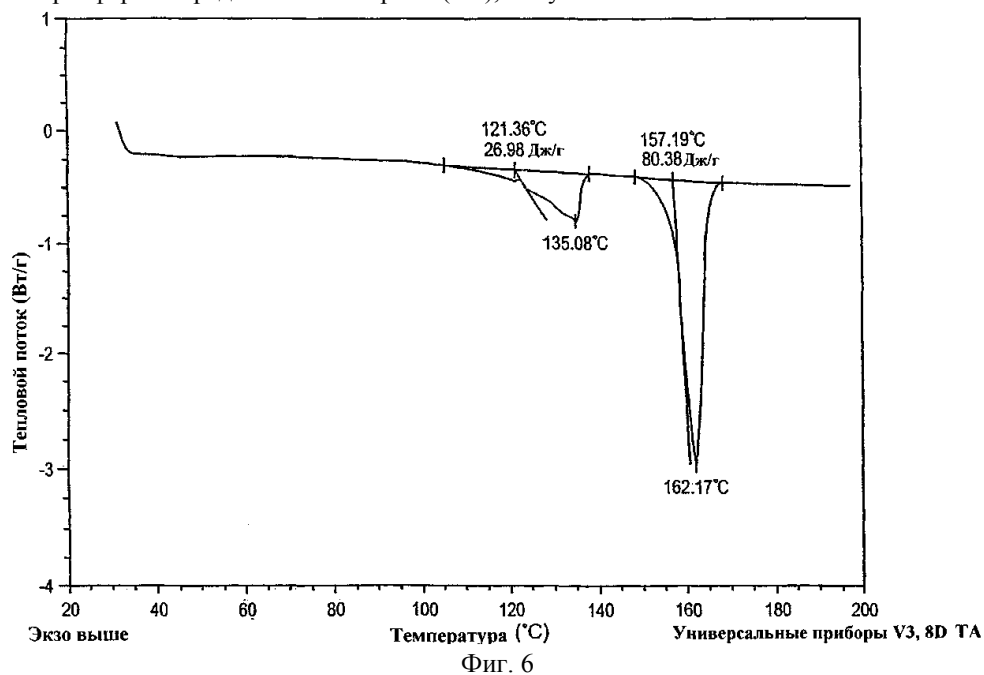
Фиг. 4

Профиль растворенного ЕС М (1:1), полученных по способу А и В

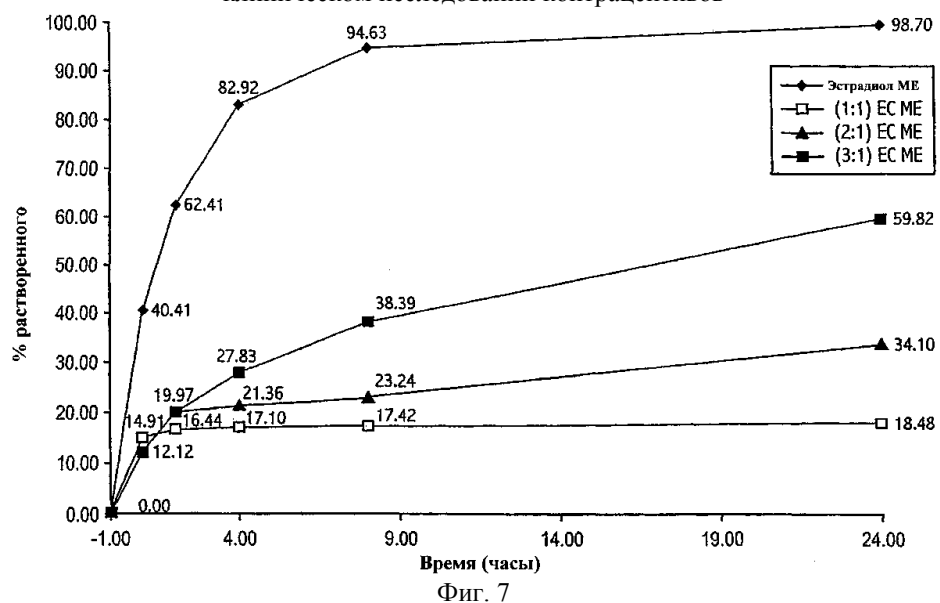


Фиг. 5

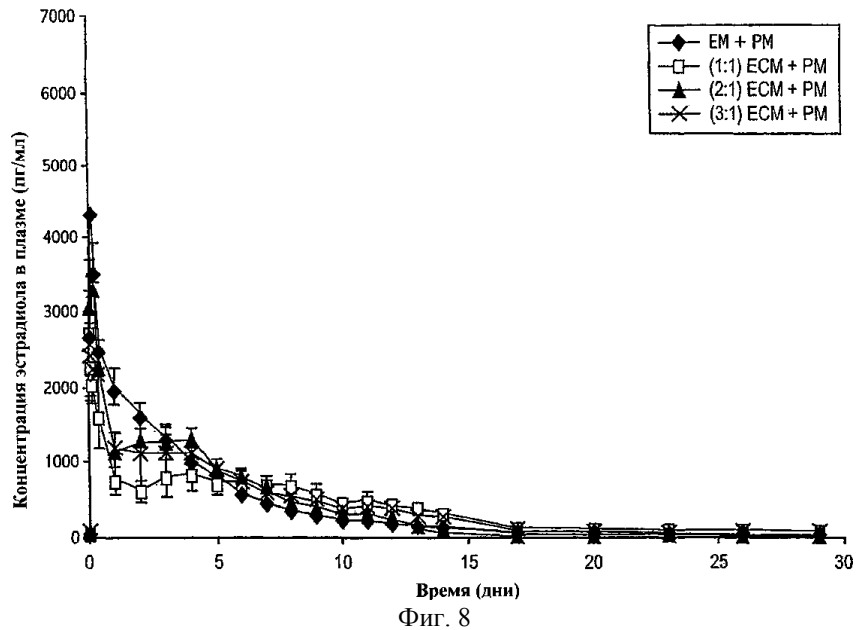
Микросферы эстрадиола-холестерина (1:1), полученные в соответствии со способом В



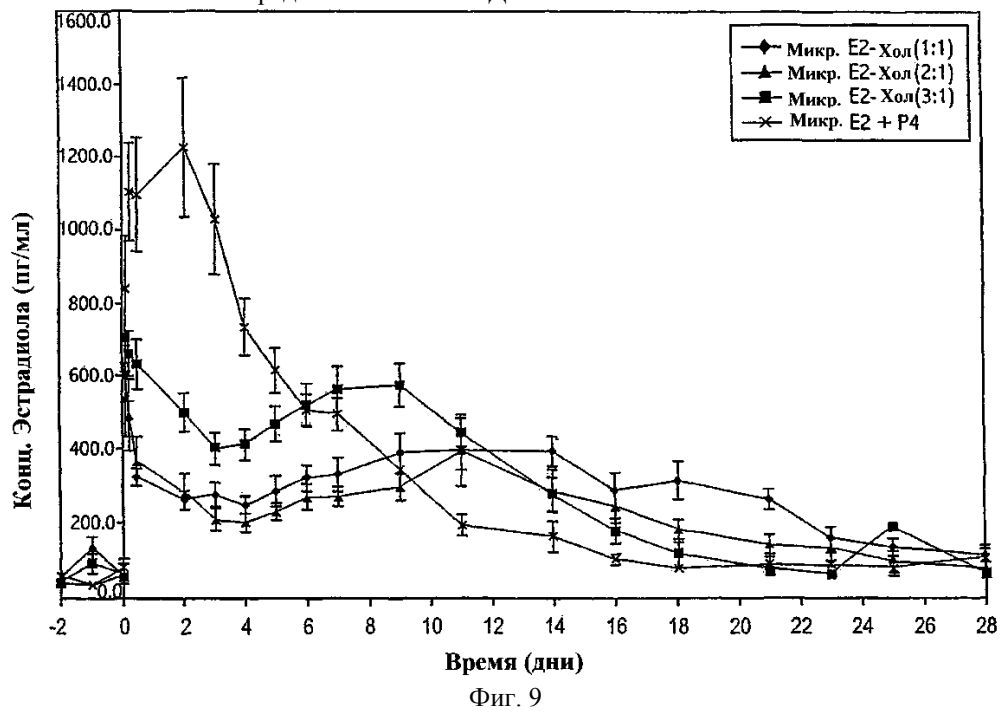
Сравнительные профили растворения Е и ЕС М (1:1), (2:1) и (3:1), используемых в клиническом исследовании контрацептивов



## Профиль эстрадиола в плазме



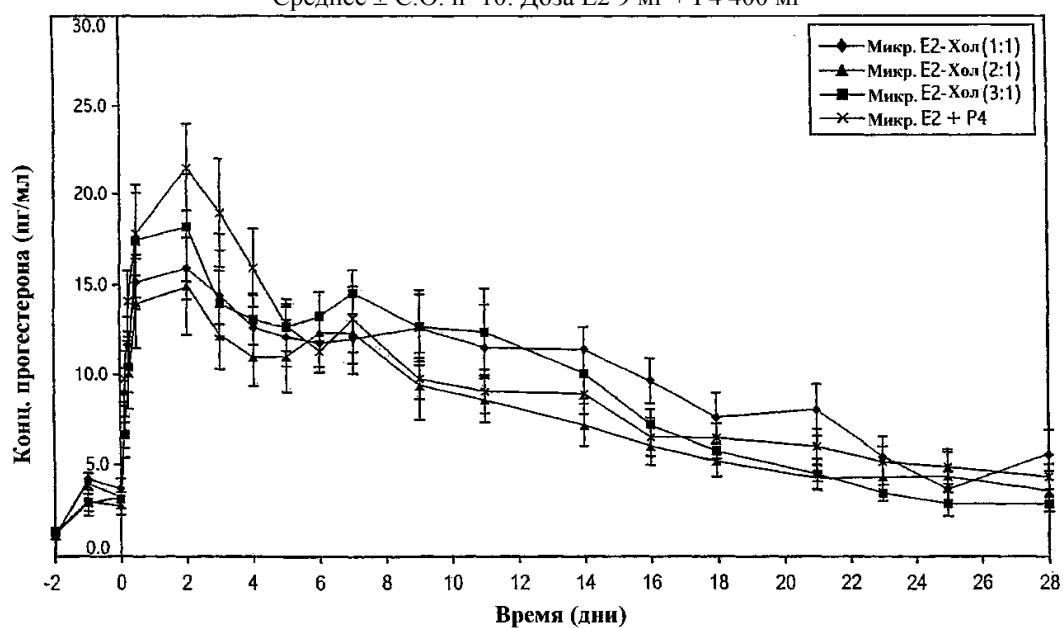
Профиль эстрадиола в плазме. Клиническое исследование 0103/I/APL.  
Среднее  $\pm$  С.О. n=10. Доза E2 9 мг + P4 400 мг





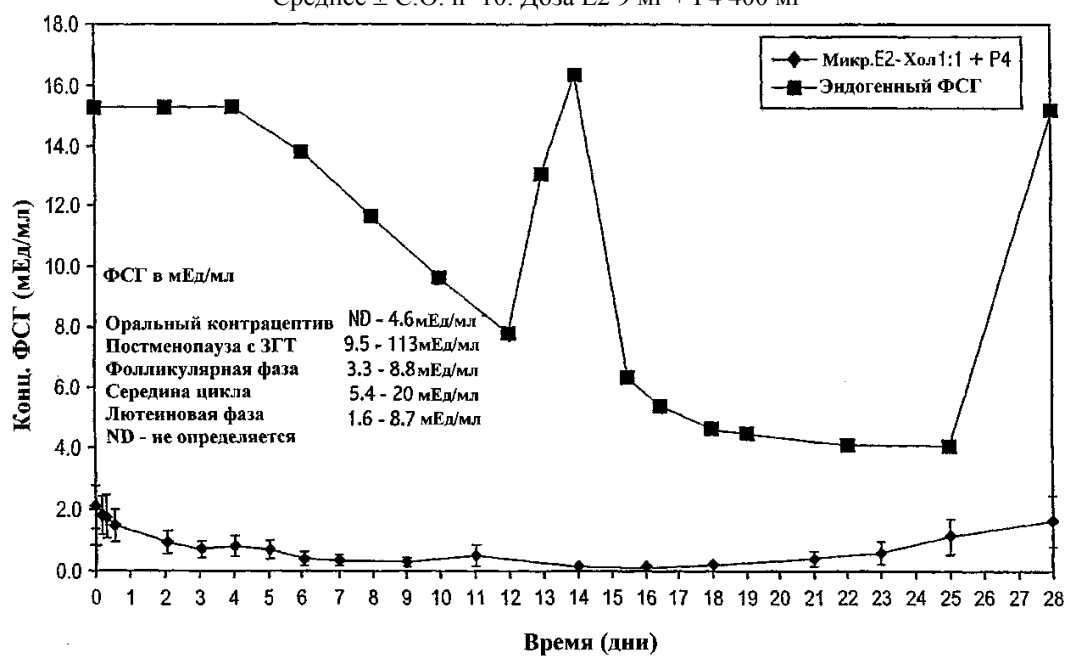
Профиль прогестерона в плазме. Клиническое исследование 0103/I/APL.

Среднее  $\pm$  С.О. n=10. Доза E2 9 мг + P4 400 мг



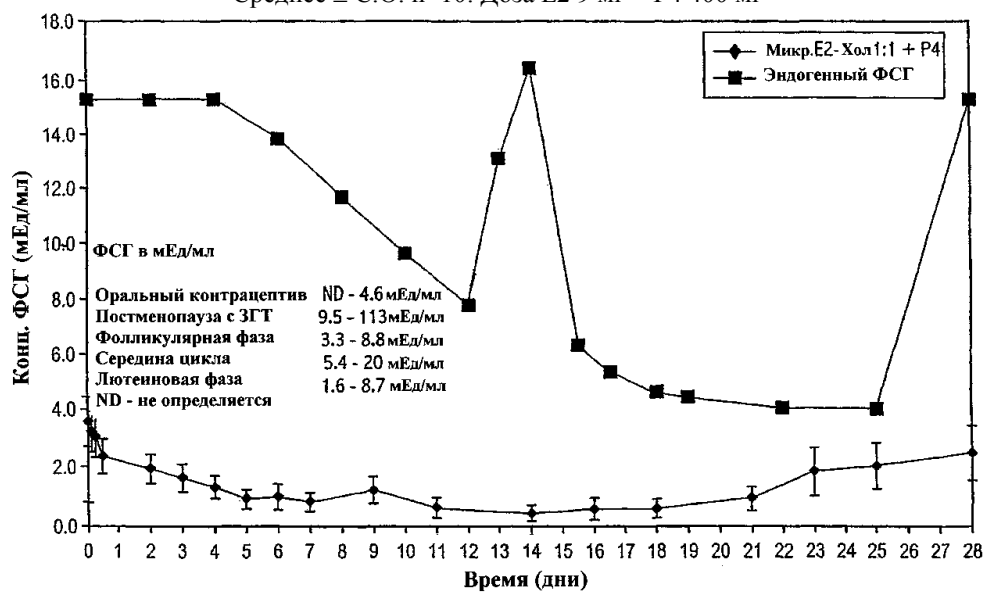
Профиль ФСГ в плазме. Клиническое исследование 0103/I/APL.

Среднее  $\pm$  С.О. n=10. Доза E2 9 мг + P4 400 мг



Профиль ФСГ в плазме. Клиническое исследование 0103/I/APL.

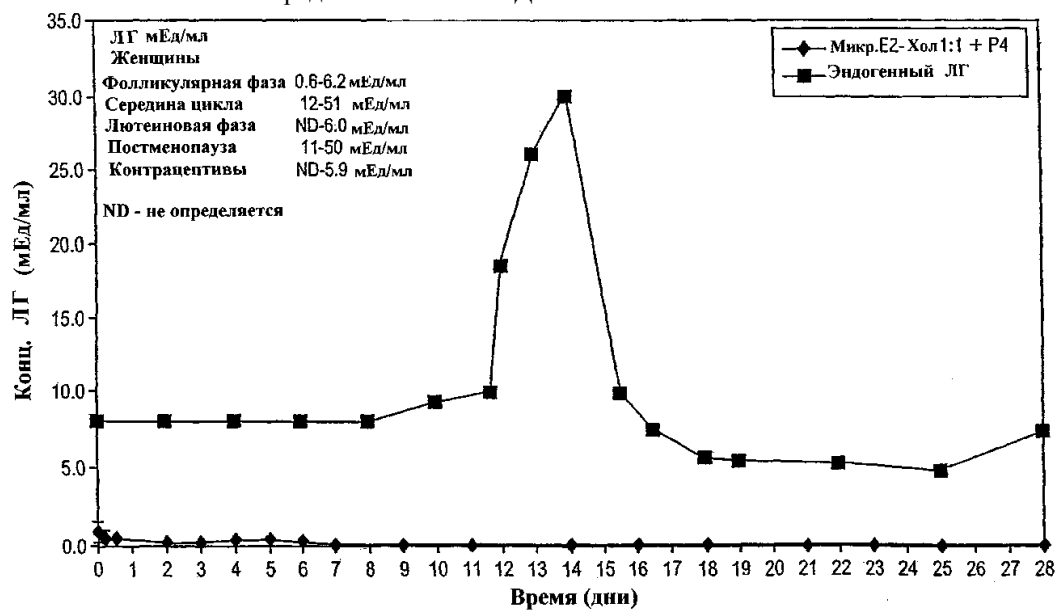
Среднее  $\pm$  С.О. n=10. Доза E2 9 мг + P4 400 мг



Фиг. 12

Профиль ЛГ в плазме. Клиническое исследование 0103/I/APL.

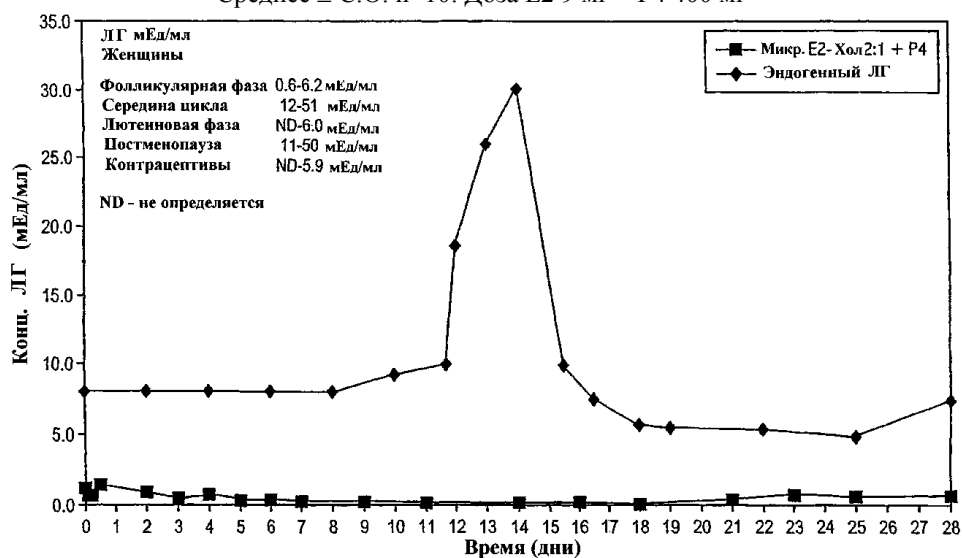
Среднее  $\pm$  С.О. n=10. Доза E2 9 мг + P4 400 мг



Фиг. 13

Профиль ЛГ в плазме. Клиническое исследование 0103/I/APL.

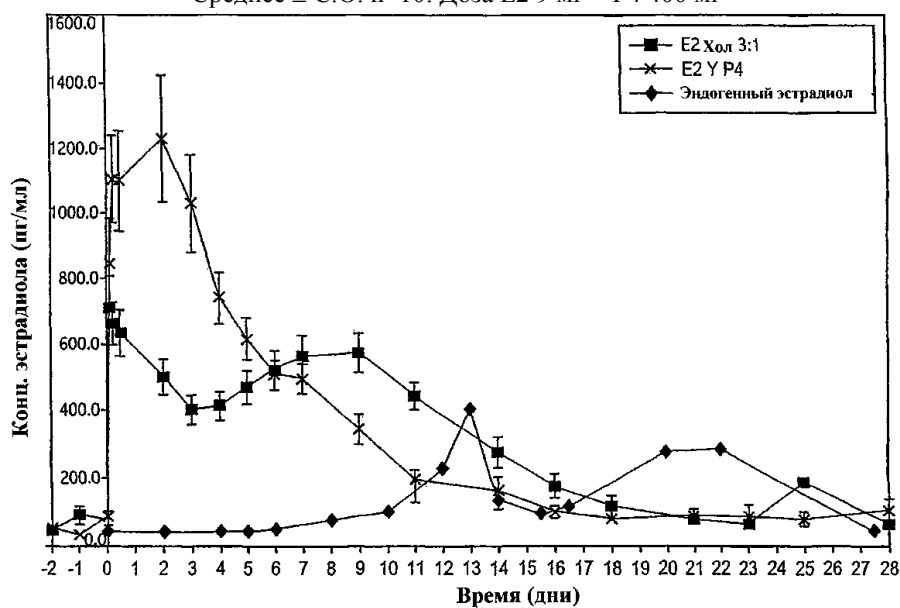
Среднее  $\pm$  С.О. n=10. Доза E2 9 мг + P4 400 мг



Фиг. 14

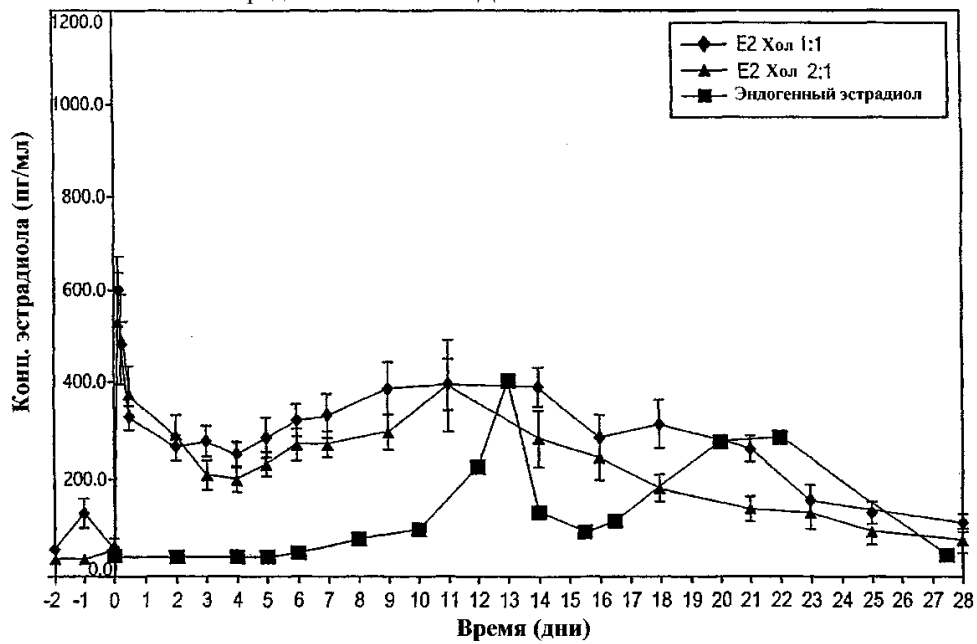
Профиль эстрадиола в плазме. Клиническое исследование 0103/I/APL.

Среднее  $\pm$  С.О. n=10. Доза E2 9 мг + P4 400 мг



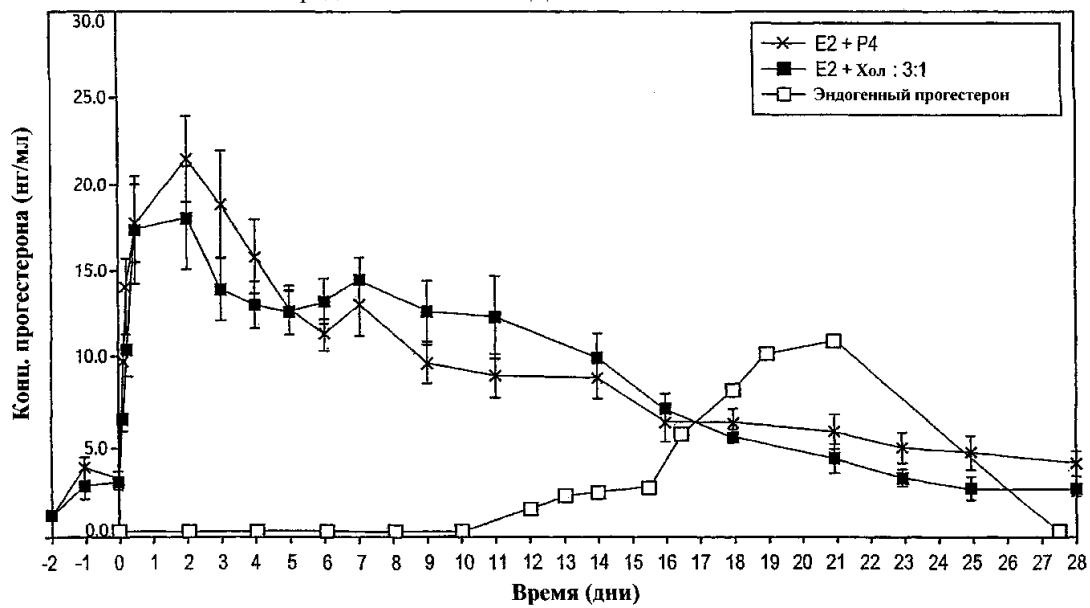
Фиг. 15

Профиль эстрадиола в плазме. Клиническое исследование 0103/I/APL.  
Среднее  $\pm$  С.О. n=10. Доза E2 9 мг + P4 400 мг



Фиг. 16

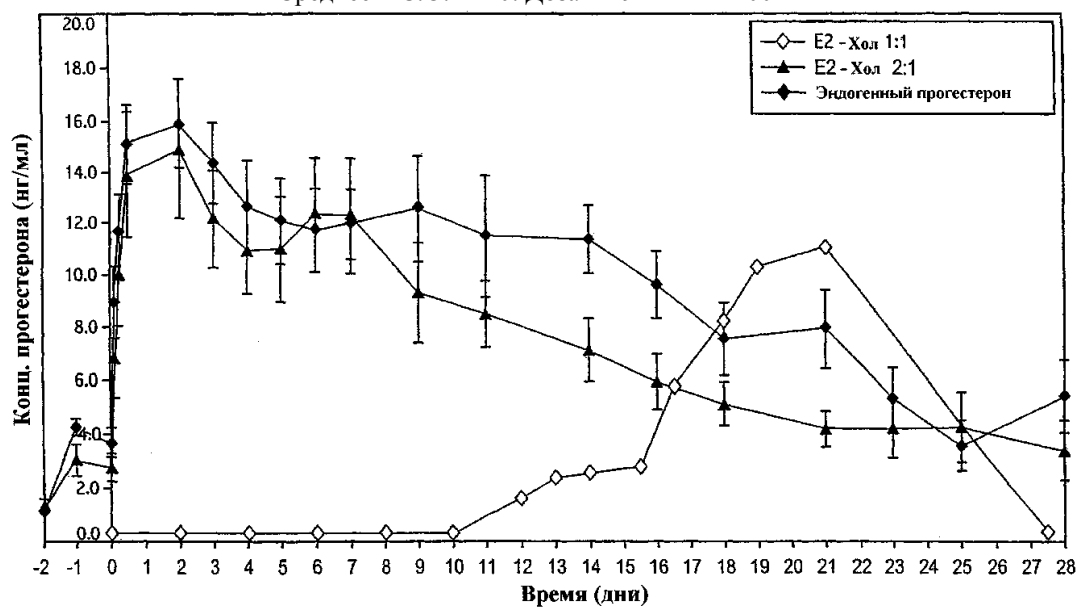
Профиль прогестерона в плазме. Клиническое исследование 0103/I/APL.  
Среднее  $\pm$  С.О. n=10. Доза E2 9 мг + P4 400 мг



Фиг. 17

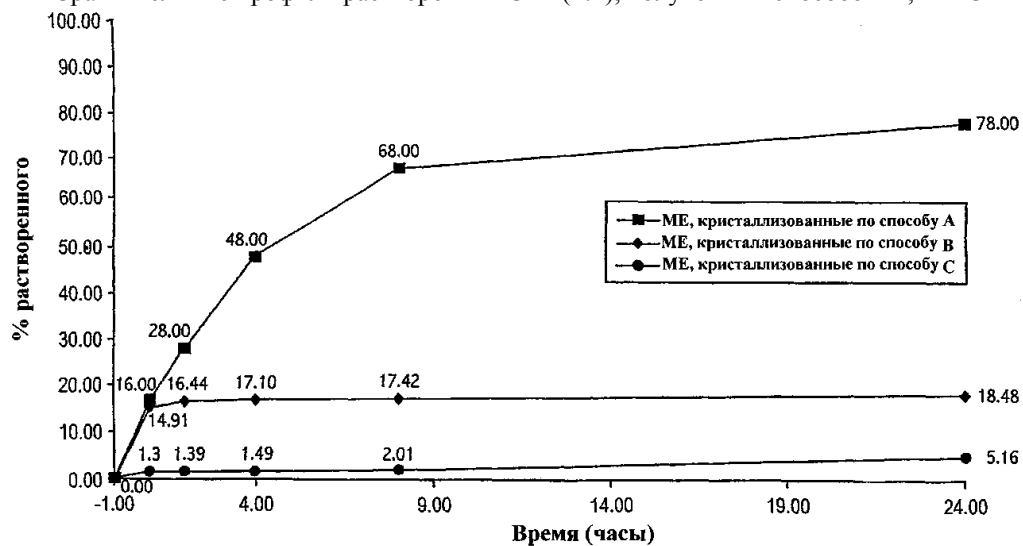
Профиль прогестерона в плазме. Клиническое исследование 0103/I/APL.

Среднее  $\pm$  С.О. n=10. Доза E2 9 мг + P4 400 мг



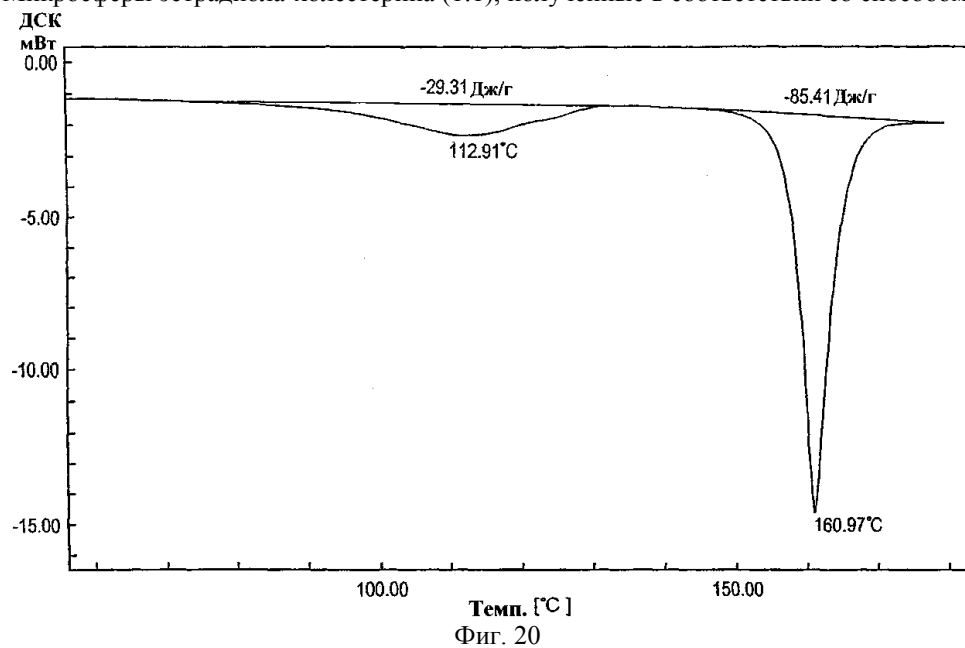
Фиг. 18

Сравнительные профили растворения ЕС М (1:1), полученных способом А, В и С

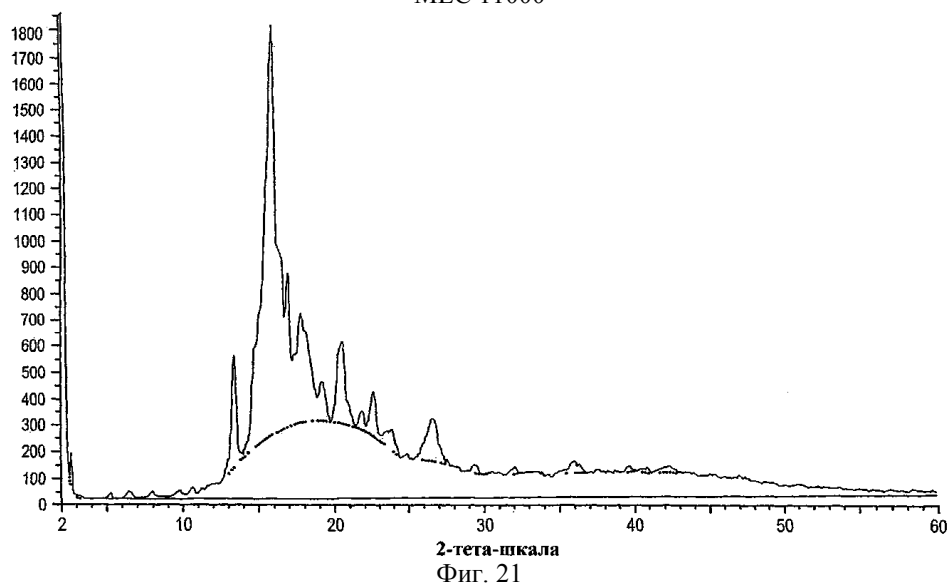


Фиг. 19

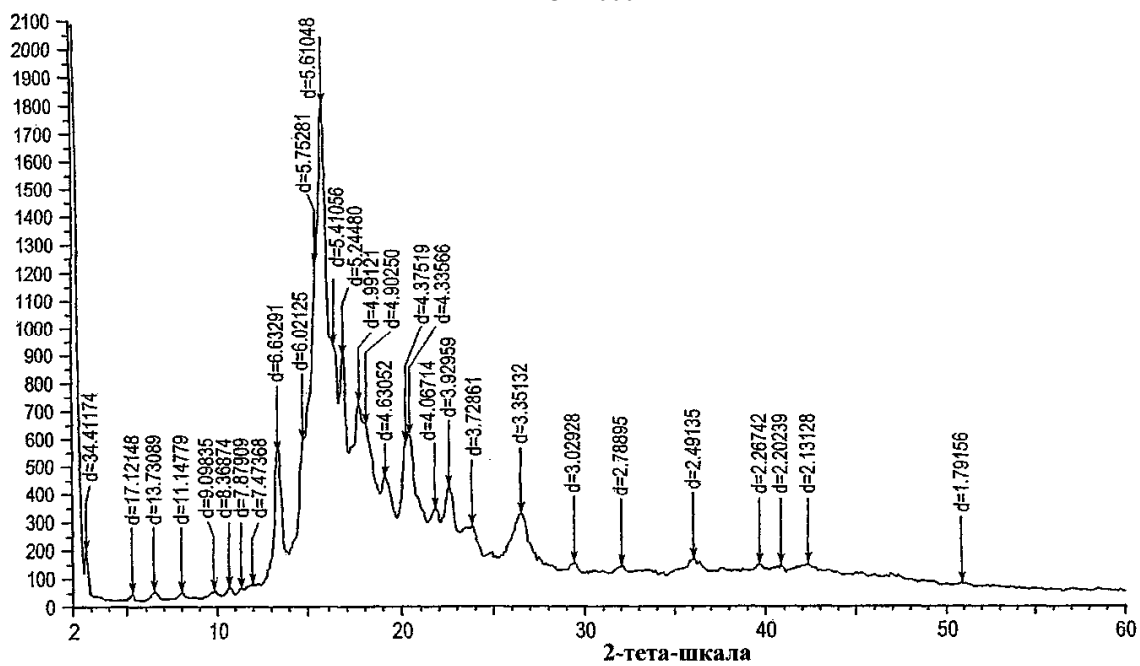
Микросферы эстрадиола-холестерина (1:1), полученные в соответствии со способом С



Микросферы эстрадиола-холестерина (1:1), полученные в соответствии со способом С.  
МЕС 11000



Микросферы эстрадиола-холестерина (1:1), полученные в соответствии со способом С.  
МЕС 11000



Фиг. 22

