

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 563**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 31/565 (2006.01)

A61K 31/57 (2006.01)

A61P 5/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2004 E 07008938 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 1844765**

54 Título: **Formulación de estradiol-progesterona de liberación lenta**

30 Prioridad:

13.06.2003 US 477939 P

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

09.06.2015

73 Titular/es:

**SKENDI FINANCE, LTD. (100.0%)
AKARA BUILDING 24 DE CASTRO STREET
WICKHAMS CAY I
ROAD TOWN, TORTOLA, VG**

72 Inventor/es:

**SAVOIR, JOHN CLAUDE y
ANGELES URIBE, JUAN**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 537 563 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulación de estradiol-progesterona de liberación lenta

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional nº de serie 60/477.939 presentada el 13 de junio de 2003, y está dividida de la solicitud EP 04 736 545.7.

10 La presente invención se refiere a formulaciones que comprenden microesferas de estradiol y colesterol, y microesferas de progesterona que tienen efectos anticonceptivos y de sustitución hormonal. Las formulaciones se combinan para liberación prolongada o retardada y facilitan la administración a intervalos de aproximadamente cuatro semanas o más.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El ciclo ovárico/menstrual es un complejo evento caracterizado por una fase folicular rica en estrógenos y, después de la ovulación, una fase lútea rica en progesterona. Cada fase dura aproximadamente 14 días, produciendo un intervalo intermenstrual de aproximadamente 28 días. El tejido endometrial responde a los cambios en niveles hormonales.

La aparición de la menstruación es el comienzo de un nuevo ciclo menstrual y se cuenta como el día uno. Durante un periodo de aproximadamente cinco a siete días, las capas superficiales del endometrio, que crecieron y se desarrollaron durante el ciclo ovárico/menstrual previo, son mudadas debido a que la muerte del cuerpo lúteo en el ciclo menstrual no fértil está asociada a la pérdida de secreción de progesterona. La maduración folicular ovárica se produce progresivamente, produciendo un aumento en los niveles en circulación de estrógeno, que a su vez conduce a la nueva proliferación endometrial.

El folículo ovárico dominante experimenta ovulación a la mitad del ciclo, generalmente entre los días del ciclo menstrual 12 a 16 y se convierte de una fuente predominantemente de estrógenos en una fuente predominantemente de progesterona (el cuerpo lúteo). El nivel creciente de progesterona en la sangre convierte el endometrio proliferativo en una fase secretora en la que la proliferación de tejido se ha reducido rápidamente, conduciendo a la formación de glándulas endometriales u órganos. Si el ovocito ovulado se fecunda viablemente y continúa su escisión embrionaria progresiva, el endometrio secretor y el producto de la anticoncepción pueden interactuar para provocar la implantación, empezando aproximadamente seis a ocho días después de la fecundación.

Si un embarazo en curso va a establecerse por implantación, el embrión se unirá y cavará en el endometrio secretor y empezará a producir gonadotropina coriónica humana (HCG). La HCG estimula a su vez la función prolongada del cuerpo lúteo, es decir, la función de la progesterona sigue siendo elevada, y no se produce la menstruación en el ciclo menstrual fértil. Entonces se establece el embarazo.

En el ciclo menstrual no fértil, el nivel menguante de progesterona en la sangre hace que el tejido endometrial sea mudado. Esto empieza un ciclo menstrual posterior.

Debido a que la proliferación endometrial sirve para preparar al útero para un embarazo inminente, la manipulación de hormonas para el entorno uterino puede proporcionar anticoncepción. Por ejemplo, se sabe que los estrógenos reducen la inhibición de la hormona estimulante del folículo por retroinhibición. En ciertas circunstancias, los estrógenos también pueden inhibir la secreción de hormona luteinizante, una vez más por autorregulación negativa. Bajo circunstancias normales, el enriquecimiento de estrógeno circulante encontrado antes de la ovulación induce la explosión de hormonas gonadotrópicas que se produce justo antes de y que produce la ovulación. Altas dosis de estrógeno pueden prevenir la anticoncepción probablemente debido a la interferencia con la implantación.

Las progestinas también pueden proporcionar anticoncepción. La progesterona endógena es responsable de los cambios progesteronales en el endometrio y los cambios cíclicos de células y tejido en el cuello uterino y la vagina. La administración de progestina hace el moco cervical denso, firme y celular, que se cree que impide el transporte espermatozoidal. La administración de progestina también inhibe la secreción de hormona luteinizante y bloquea la ovulación en seres humanos.

Hay varias formulaciones anticonceptivas actualmente en el mercado que pueden clasificarse fácilmente en varios tipos generales. Las primeras de éstas se conocen como formulaciones monofásicas. Las formulaciones monofásicas contienen una cantidad constante de estrógeno y progestina. Los efectos secundarios causantes de molestia con las píldoras de formulación monofásica dependen del equilibrio entre el componente de estrógeno y de progestina de la píldora. Por ejemplo, con una píldora relativamente dominante de progestina, la formulación producirá, con el tiempo, un agotamiento de tanto los receptores de estrógeno como de progestina. El resultado, que podría esperarse, es un endometrio infraestimulado o atrófico, que puede producir con el tiempo tanto amenorrea

tomando la píldora como metrorragia intermenstrual u oligometrorragia debido a mala epitelialización. Por otra parte, con una preparación estrogénica relativamente dominante, es posible que el uso prolongado pudiera producir crecimiento endometrial con el desarrollo de estroma frágil no soportado y posterior oligometrorragia o metrorragia intermenstrual.

5 Nuevas formulaciones conocidas como trifásicas tienen niveles variables de estrógeno y progestina; que consisten en la mayoría de los casos en niveles relativamente constantes de estrógeno con un aumento escalonado en progestina a lo largo del ciclo. Este patrón de administración de estrógenos y progestina produce una formulación estrogénica relativamente dominante al principio del envase con actividad progestigénica creciente hacia el final del
10 envase. La estabilidad endometrial puede ser mejor con estas píldoras, ya que la actividad estrogénica al principio del envase induce tanto receptores de estrógeno como de progestina, haciendo el endometrio sensible a los elevados niveles de progestina hacia el final del envase. La actividad de la progestina produce estroma endometrial más denso, más estable, aunque la duración relativamente larga de la exposición a progestina, hacia el final del envase, todavía puede conducir a reducir los receptores y actividad del estrógeno y de la progestina.

15 Un problema significativo con este tipo de formulación es la baja dosis de esteroides al principio del envase, que hace vulnerables estas píldoras a las interacciones con fármacos, o píldoras omitidas, que puede conducir a ovulación repentina. El inicio del envase es el momento crítico en términos de ovulación repentina, ya que el usuario acaba de completar un intervalo libre de fármaco de siete días durante el cual el desarrollo folicular puede empezar.
20 Aunque no se produce el embarazo, la ovulación repentina puede conducir a un mal control del ciclo.

El 17- β -estradiol (E₂) es el estrógeno natural más potente encontrado en los seres humanos y es el principal producto secretor de los ovarios. Se oxida fácilmente en el cuerpo a estrona E, que a su vez puede hidratarse dando
25 estriol. Estas transformaciones tienen lugar principalmente en el hígado, en el que hay libre interconversión entre E₁ y estradiol. Estos tres estrógenos naturales son secretados en la orina como glucuronidos y sulfatos, junto con una multitud de productos minoritarios relacionados en complejos solubles en agua. Se sabe ampliamente que, tras la administración por vía oral de E₂ micronizado, la circulación gradual de estrógeno es principalmente la especie menos activa E₁, que alcanza una concentración pico muchas veces superior a la de E₂. La conversión de E₂ a E₁ y posteriormente en otros metabolitos tiene lugar durante la absorción del intestino y el paso a través del hígado.
30 Este amplio metabolismo limita enormemente la eficacia oral de los estrógenos naturales y sus ésteres. De hecho, debido a su eficacia oral limitada, E₂ y sus ésteres se administran generalmente por inyecciones intramusculares.

La progesterona (P₄) es la progestina natural activa, que se produce en el cuerpo lúteo, placenta y la corteza suprarrenal. Al igual que E₂, P₄ también es ineficaz por administración por vía oral debido a su rápido metabolismo
35 en el epitelio intestinal y en el hígado y, por tanto, solo se administra intramuscularmente.

Debido a su eficacia oral limitada, los trabajadores en la materia consideran estas hormonas sexuales femeninas naturales como no deseables en la formulación de anticonceptivos orales. En su lugar, los trabajadores se han centrado en la fabricación y administración de estrógenos y progestinas sintéticos para fines anticonceptivos. El uso
40 de derivados sintéticos también ha sustituido a las sustancias naturales en el tratamiento de la menopausia, amenaza de aborto, etc. Sin embargo, es más probable que estos derivados sintéticos produzcan efectos secundarios tóxicos que las hormonas endógenas relativamente seguras.

Mientras que las modificaciones químicas de hormonas naturales presentan actividad oral potenciada, también
45 pueden producir una variedad de efectos secundarios no deseables. Por ejemplo, los derivados sintéticos de hormonas naturales son conocidos por tener un efecto estimulante adverso sobre la síntesis de proteínas del hígado (posiblemente promocionando la trombosis) y presentan un efecto diabetogénico, a diferencia de las hormonas sexuales naturales.

El estrógeno sintético, por ejemplo, se resorbe rápidamente en el estómago y el tubo digestivo. Debido a que es
50 fácilmente metabolizado, se absorbe rápidamente en la membrana mucosa del intestino delgado y/o experimenta cambios químicos rápidos. Por consiguiente, pueden resultar grandes diferencias individuales en la biodisponibilidad. Además, los estradiolos sintéticos pueden conducir a una acumulación no deseable de ciertos zenobióticos y son conocidos por presentar propiedades carcinogénicas.

55 Las progestinas sintéticas también son conocidas por presentar efectos secundarios no deseables que incluyen, por ejemplo, masculinización y efectos adversos sobre los niveles de colesterol, niveles de triglicéridos y niveles de lipoproteína de alta densidad. Las progestinas sintéticas también pueden producir retención de líquidos y depresión.

60 Un efecto secundario no deseable adicional que puede afectar a los sujetos que toman tratamiento anticonceptivo hormonal sintético es la reducción/cese de la producción de hormonas naturales. Muchos sujetos también sufren un desequilibrio hormonal no deseable resultante del cese de la ovulación debido al efecto anticonceptivo de hormonas sintéticas administradas.

65 Se desvelan formulaciones farmacéuticas que incluyen hormonas endógenas en el documento US 6 287 693. Esa memoria descriptiva desvela partículas que consisten en una mezcla de estradiol y colesterol, y partículas que

comprenden progesterona.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 Según un aspecto de la invención, se proporciona una formulación que tiene efectos anticonceptivos y de sustitución hormonal en un mamífero hembra que comprende microesferas de 17- β -estradiol y colesterol, y microesferas de progesterona, en la que el 17- β -estradiol es del 45 al 65 % amorfo y del 35 al 55 % cristalino, y en la que la formulación tiene una tasa de disolución de estradiol (EDR) del 20 % o menos.

10 La invención proporciona además una formulación de la invención para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra.

La invención proporciona además una formulación de la invención para su uso en terapia de sustitución hormonal en un mamífero hembra en los cinco primeros años de la menopausia.

15 La presente invención permite la administración de las hormonas naturales con una vida prolongada en el organismo por medio de un sistema de liberación prolongada. La administración de las hormonas naturales precipita el efecto de autorregulación negativa mientras que proporciona la sustitución de las hormonas endógenas inhibidas.

20 Así, la presente invención permite obtener efectos anticonceptivos y de sustitución hormonal simultáneos con una formulación que comprende una cantidad eficaz anticonceptiva y eficaz para sustitución hormonal de una combinación de hormonas naturales o miméticos de hormonas. La formulación comprende al menos un estrógeno y al menos una progestina. Preferentemente, la formulación comprende las hormonas que se producen naturalmente 17- β -estradiol (E2) y progesterona (P4).

25 Administrando cantidades eficaces de E2 y P4, las formulaciones de la presente invención proporcionan anticoncepción eficaz y fiable sin los efectos secundarios no deseables comúnmente asociados a los anticonceptivos formulados con hormonas sintéticas activas por vía oral. Adicionalmente, debido a que las formulaciones se combinan para producir un perfil de disolución prolongada, las hormonas tienen altos tiempos medios de permanencia y evitan los inconvenientes de la corta semivida tradicional de las hormonas naturales. Entre otras cosas, las formulaciones de la presente invención se preparan según métodos desvelados en la patente de EE.UU. nº 5360616 y se cristalizan según métodos desvelados en la patente de EE.UU. nº 6528094 B1.

30 Las formulaciones de la presente invención proporcionan beneficios de sustitución hormonal eficaces. Debido a que las formulaciones se combinan con hormonas que se producen naturalmente, la administración de aquellas formulaciones sirve para restaurar o complementar las hormonas que se producen naturalmente producidas de otro modo en un mamífero hembra en edad reproductiva. Los anticonceptivos convencionales que comprenden hormonas sintéticas activas por vía oral no proporcionan tales beneficios de sustitución hormonal.

35 Los agentes de estrógeno y progestina de las formulaciones de la presente invención están presentes en la formulación en una cantidad eficaz anticonceptiva y eficaz para sustitución hormonal. Basándose en dosis unitarias, las formulaciones de la presente invención pueden comprender aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg de 17- β -estradiol y/o aproximadamente 200 a aproximadamente 500 mg de progesterona. Realizaciones particularmente preferidas son formulaciones que comprenden aproximadamente 9 mg de 17- β -estradiol y aproximadamente 400 mg de progesterona por dosis unitaria. Así, el término "cantidad eficaz anticonceptiva y eficaz para sustitución hormonal" de 17- β -estradiol y progesterona, cuando se refiere a un mamífero, particularmente un ser humano femenino, pretende referirse a una formulación que comprende 17- β -estradiol y progesterona en una relación de peso de aproximadamente 1:40. Preferentemente, la relación de peso es aproximadamente 9:400. El término "dosis unitaria" se refiere a una cantidad suficiente para efectuar tanto la anticoncepción como la terapia de sustitución hormonal en un sujeto durante al menos un ciclo menstrual completo.

40 En una realización, la formulación comprende una pluralidad de microesferas que comprenden al menos uno de 17- β -estradiol y progesterona, y las microesferas se suspenden en un vehículo acuoso para administración (como se usa en el presente documento, el término microesferas incluye micropartículas, microcápsulas, liposomas y similares). Preferentemente, el estradiol y la progesterona en la microesfera están en forma cristalina.

45 Según otro aspecto de la invención, la formulación comprende una preparación acuosa que comprende microesferas de un estrógeno y/o una progestina. Las microesferas tienen preferentemente aproximadamente 25 μ m a aproximadamente 105 μ m de diámetro: más preferentemente aproximadamente 35 μ m a aproximadamente 75 μ m. Las microesferas se combinan preferentemente con otros agentes, vehículos y excipientes de forma que la formulación sea adecuada para administración parenteral por jeringa hipodérmica.

50 Puede lograrse un efecto anticonceptivo y de sustitución hormonal simultáneo administrando a un sujeto una formulación que comprende una cantidad eficaz anticonceptiva y eficaz para sustitución hormonal de 17- β -estradiol y progesterona. El sujeto de tal administración es preferentemente un mamífero hembra en edad reproductiva,

también denominado en el presente documento una “hembra fértil”.

La invención proporciona además una formulación que comprende partículas de 17- β -estradiol y colesterol, y partículas de progesterona, y en la que el 17- β -estradiol y la progesterona están en una relación de peso de 3:40 a 1:100 y en la que el 17- β -estradiol es del 45 al 65 % amorfo y del 35 al 55 % cristalino, y en la que la formulación tiene una tasa de disolución de estradiol (EDR) del 20 % o menos, para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra.

En el presente documento también se desvela un método para los efectos de anticoncepción y sustitución hormonal simultáneos que comprende administrar a un sujeto una formulación que comprende microesferas de al menos uno de 17- β -estradiol y progesterona. Preferentemente, la formulación es una dispersión o suspensión de dichas microesferas en un vehículo líquido. El 17- β -estradiol y la progesterona están presentes en la formulación en una cantidad eficaz anticonceptiva y eficaz para la sustitución hormonal. En el caso de seres humanos femeninos, la cantidad eficaz de 17- β -estradiol es aproximadamente 9 mg y la cantidad eficaz de progesterona es aproximadamente 400 mg.

Un método preferido para lograr el efecto de anticoncepción y sustitución hormonal simultáneo incluye la administración parenteral de una formulación de estrógeno/progestina a un sujeto. Preferentemente, la formulación se administra por inyección intramuscular. Las formulaciones de la presente invención son formulaciones retardadas o de liberación prolongada que pueden administrarse eficazmente a intervalos de aproximadamente cuatro semanas sin pérdida del efecto anticonceptivo o de sustitución hormonal durante el periodo intermedio.

Las formulaciones de la presente invención pueden combinarse en una variedad de formas para almacenamiento, transporte o administración. Las formulaciones pueden combinarse como dispersiones de las microesferas en un vehículo acuoso para administración parenteral, siendo el tamaño de partícula preferentemente aproximadamente 25 μ m a aproximadamente 105 μ m; y más preferentemente aproximadamente 35 μ m a aproximadamente 75 μ m.

Un kit puede comprender una formulación que comprende una cantidad anticonceptiva y eficaz para sustitución hormonal de 17- β -estradiol y progesterona, en la que la formulación comprende preferentemente aproximadamente 9 mg de 17- β -estradiol y aproximadamente 400 mg de progesterona.

La presente invención, mediante el uso de cantidades eficaces anticonceptivas y eficaces para sustitución hormonal de 17- β -estradiol y progesterona, reconoce una ventaja importante, ya que puede minimizar o eliminar sustancialmente los efectos secundarios no deseables comúnmente asociados a las formulaciones de anticonceptivos que contienen hormonas sintéticas convencionales. Adicionalmente, mediante el uso de cantidades eficaces de estas hormonas endógenas, la presente invención reconoce otra ventaja importante, ya que puede proporcionar a los sujetos hormonas naturales a niveles equivalentes a la producción mensual natural promedio, evitando así desequilibrios de hormonas no deseables.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Representación del perfil plasmático medio de estradiol, escala aritmética.

Figura 2: Representación del perfil plasmático de progesterona, escala aritmética.

Figura 3A: Un difractograma de rayos X de (40:60) microesferas de estradiol-colesterol antes de la cristalización.

Figura 3B: Un difractograma de rayos X de (40:60) microesferas de estradiol-colesterol después de la cristalización.

Figura 4: El perfil de disolución de (60:40) microesferas de estradiol-colesterol después de la cristalización en estado sólido según el método de USPN 6.528.094 B1.

Figura 5: Perfiles de disolución comparativos de (1:1) microesferas de estradiol-colesterol preparadas por el proceso de cristalización A (Ejemplo 2) y el proceso de cristalización B (Ejemplo 3).

Figura 6: DSC de (1:1) microesferas de estradiol-colesterol preparadas según el proceso B.

Figura 7: Perfiles de disolución comparativos de microesferas de estradiol (E); y estradiol-colesterol (1:1), (1:2) y (1:3) como se usan en el estudio clínico anticonceptivo y se preparan según el proceso de cristalización B.

Figura 8: Perfil plasmático de estradiol en función del tiempo para microesferas de estradiol (E) y estradiol-colesterol (1:1), (1:2) y (1:3) preparadas según el proceso de cristalización B.

Figura 9: Perfil plasmático de estradiol en función del tiempo para microesferas de estradiol (E) y estradiol-colesterol (1:1), (1:2) y (1:3); dosis, estradiol 9 mg y progesterona 400 mg; y preparadas según el proceso de cristalización B.

Figura 10: Perfil plasmático de progesterona en función del tiempo para microesferas de estradiol (E) y estradiol-colesterol (1:1), (1:2) y (1:3); dosis, estradiol 9 mg y progesterona 400 mg; y preparadas según el proceso de cristalización B.

Figura 11: Perfil plasmático de FSH en función del tiempo para microesferas de estradiol-colesterol (1:1) y progesterona; dosis, estradiol 9 mg y progesterona 400 mg; y preparadas según el proceso de cristalización B frente a FSH endógena.

Figura 12: Perfil plasmático de FSH en función del tiempo para microesferas de estradiol-colesterol (2:1) y

progesterona; dosis, estradiol 9 mg y progesterona 400 mg; y preparadas según el proceso de cristalización B frente a FSH endógena.

Figura 13: Perfil plasmático de hormona luteinizante en función del tiempo para microesferas de estradiol-colesterol (1:1) y progesterona; dosis, estradiol 9 mg y progesterona 400 mg; y preparadas según el proceso de cristalización B frente a LH endógena.

Figura 14: Perfil plasmático de hormona luteinizante en función del tiempo para microesferas de estradiol-colesterol (2:1) y progesterona; dosis, estradiol 9 mg y progesterona 400 mg; y preparadas según el proceso de cristalización B frente a LH endógena.

Figura 15: Perfil plasmático de estradiol en función del tiempo para microesferas de estradiol-colesterol (3:1) y progesterona, y estradiol y progesterona; dosis, estradiol 9 mg y progesterona 400 mg; y preparadas según el proceso de cristalización B frente a estradiol endógeno.

Figura 16: Perfil plasmático de estradiol en función del tiempo para microesferas de estradiol-colesterol (1:1) y progesterona, y estradiol-colesterol (2:1) y progesterona; dosis, estradiol 9 mg y progesterona 400 mg; y preparadas según el proceso de cristalización B frente a estradiol endógeno.

Figura 17: Perfil plasmático de progesterona en función del tiempo para microesferas de estradiol y progesterona, y estradiol-colesterol (3:1) y progesterona; dosis, estradiol 9 mg y progesterona 400 mg; y preparadas según el proceso de cristalización B frente a progesterona endógena.

Figura 18: Perfil plasmático de progesterona en función del tiempo para microesferas de estradiol-colesterol (1:1) y progesterona, y estradiol-colesterol (2:1) y progesterona; dosis, estradiol 9 mg y progesterona 400 mg; y preparadas según el proceso de cristalización B frente a progesterona endógena.

Figura 19: Perfiles de disolución comparativos de (1:1) de microesferas de estradiol-colesterol como se preparan por los procesos de cristalización A, B y C.

Figura 20: DSC de microesferas de estradiol-colesterol (1:1) preparadas según el proceso C.

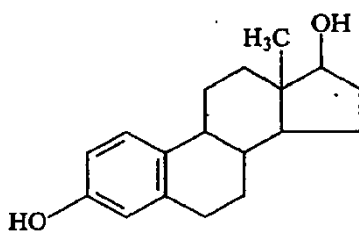
Figura 21: Difractograma de rayos X de microesferas de estradiol-colesterol (1:1) preparadas según el proceso C.

Figura 22: Difractograma de rayos X de microesferas de estradiol-colesterol (1:1) preparadas según el proceso C.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

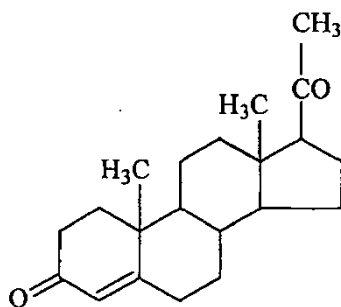
La presente invención permite administrar cantidades eficaces anticonceptivas y eficaces para sustitución hormonal de 17- β -estradiol y progesterona a un sujeto de una manera controlada para minimizar y/o eliminar sustancialmente los efectos secundarios no deseables comúnmente asociados a terapias anticonceptivas de hormonas sintéticas. Adicionalmente, la presente invención proporciona estas hormonas naturales a niveles equivalentes a su producción mensual natural promedio.

El término "17- β -estradiol", como se usa en el presente documento, engloba cualquier forma estrogénicamente activa farmacéuticamente aceptable de 17- β -estradiol, es decir, el propio estra-1,3,5(10)-trieno-3,17- β -diol, que tiene la fórmula:



o uno de sus ésteres. El 17- β -estradiol puede obtenerse a partir de fuentes naturales o prepararse sintéticamente. Ésteres de 17- β -estradiol adecuados, para los fines de la presente invención, incluyen, por ejemplo, 3-monoésteres tales como benzoato de estradiol y 3-acetato de estradiol; 17-monoésteres tales como ciponato de estradiol, 17-propionato de estradiol, 17-acetato de estradiol, 17-heptanoato de estradiol (enantato de estradiol), 17-undecanoato de estradiol (undecilato de estradiol) y 17-valerato de estradiol; y 3,17-diésteres tales como dipropionato de estradiol y diacetato de estradiol, y similares, y combinaciones de los mismos.

El término "progesterona", como se usa en el presente documento, se refiere a pregn-4-eno-3,20-diona, es decir, el compuesto de fórmula:



y pretende incluir progesterona derivada de fuentes naturales, además de aquella preparada sintéticamente.

- 5 En realizaciones preferidas de la presente invención, las formulaciones comprenden suspensiones acuosas de microesferas que comprenden un estrógeno (17- β -estradiol (E2)) y una progestina (progesterona (P4)) en una cantidad eficaz anticonceptiva y eficaz para sustitución hormonal.

Adicionalmente, las microesferas de tales realizaciones comprenden el esteroide endógeno adicional colesterol.

- 10 El esteroide endógeno adicional es preferentemente inerte con respecto a los agentes de estrógeno/progestina y tiene solubilidad sustancialmente reducida en fluidos biológicos tales como la sangre. Cuando se formulan así, las microesferas de colesterol/estrógeno/progestina se combinan de tal forma que los agentes de estrógeno/progestina estén uniformemente distribuidos en todo el esteroide relativamente inerte de forma que la disolución de aquellos agentes sea retardada, pero sin embargo continua y sustancialmente estacionaria. Preferentemente, el esteroide inerte, además del estrógeno y la progestina, están en forma cristalina dentro de la microesfera. Como se trata más completamente más adelante, la tasa sustancialmente estacionaria de disolución de los agentes activos facilita así una liberación controlada de los agentes activos durante un periodo prolongado. Preferentemente, el periodo prolongado es al menos un ciclo menstrual completo, y en el caso de un ser humano femenino es al menos aproximadamente 4 semanas.

- En realizaciones de la invención, las cantidades eficaces anticonceptivas y eficaces para sustitución hormonal de E2 y P4 son cantidades que son adecuadas para proporcionar un efecto anticonceptivo y de sustitución hormonal simultáneo. En particular, con respecto al efecto anticonceptivo, la cantidad eficaz de E2 y P4 es una cantidad que es suficiente para actuar sobre el hipotálamo y la pituitaria del sujeto que está tratándose para inhibir la liberación de hormonas gonadotrópicas necesarias para mantener la función ovárica normal.

- Además, la cantidad eficaz de sustitución hormonal de E2 y P4 es una cantidad suficiente para sustituir sustancialmente el suministro natural de estas hormonas cuya producción endógena se reduce y/o elimina con el cese de la ovulación.

- En realizaciones preferidas de la invención, las cantidades eficaces anticonceptivas y eficaces para sustitución hormonal de E2 y P4 son aquellas adecuadas para lograr el efecto deseado en un ser humano femenino y, basándose en una dosis unitaria, son aproximadamente 5 mg a aproximadamente 15 mg de estradiol y aproximadamente 300 mg a aproximadamente 500 mg de progesterona. Las realizaciones más preferidas comprenden aproximadamente 9 mg de 17- β -estradiol y aproximadamente 400 mg de progesterona.

- La formulación de la presente invención comprende microesferas que contienen hormona para proporcionar administración controlada, predecible y reproducible de las hormonas contenidas en su interior. Diversas características fisicoquímicas de las microesferas son importantes para conseguir la liberación controlada de las hormonas. En particular, la solubilidad, tamaño y composición polimórfica de las microesferas tienen un efecto sustancial sobre la tasa de liberación. Por ejemplo, cuanto mayor sea diámetro de la microesfera, más tiempo se necesitará para que el nivel hormonal alcance valores indetectables. En la presente invención, el diámetro de las microesferas es preferentemente aproximadamente 25 μm a aproximadamente 125 μm ; más preferentemente aproximadamente 35 μm a aproximadamente 105 μm ; y lo más preferentemente aproximadamente 35 μm a aproximadamente 75 μm .

- Como las hormonas naturales E2 y P4 son conocidas por degradarse metabólicamente cuando se administran por vía oral, la formulación de la presente invención se administra preferentemente a sujetos por administración parenteral, particularmente inyección intramuscular. El objetivo es proporcionar un efecto anticonceptivo mientras que se proporciona simultáneamente un efecto de sustitución hormonal suministrando niveles naturales de E2 y P4. Además, las formulaciones de la presente invención promueven el establecimiento de ciclos menstruales mensuales sanos de aproximadamente 28 días \pm 3 días. En realizaciones preferidas, las formulaciones de la presente invención se administran a un sujeto mediante inyección mensual usando un medio adecuado de inyección tal como, por ejemplo, una aguja hipodérmica de calibre 18 o 20.

Las formulaciones de la presente invención comprenden cantidades eficaces anticonceptivas y eficaces para el sustitución hormonal de un estrógeno (E2) y una progestina (P4) combinados en una formulación de liberación prolongada o retardada. Tales formulaciones de liberación retardada pueden incluir el estrógeno y la progestina combinados con un vehículo, excipiente o aglutinante que tiene solubilidad reducida en los fluidos biológicos en el sitio de administración, tal como colesterol. El colesterol tiene sustancialmente menos solubilidad en fluidos biológicos tales como la sangre en comparación con estrógenos y progestinas, y así disminuye la disolución de aquellos agentes activos, y así retarda la liberación de aquellos agentes activos en la circulación sanguínea. Información adicional que podría ser instructiva en la preparación de tales formulaciones de microesferas de liberación retardada se encuentran en las patentes de EE.UU. nº 5.360.616; 5.512.303; 5.633.014; 5.643.604; y 6.287.693.

En al menos una realización preferida, una formulación de liberación retardada de la presente invención se prepara mezclando el estrógeno minuciosamente y uniformemente en todo un vehículo de colesterol. La mezcla de estrógeno/progestina/colesterol puede solidificarse fundida y/o extruirse o procesarse de otro modo en una pluralidad de partículas de tamaño y forma deseados, y someterse a una cristalización en estado sólido como se ha desvelado en la patente de EE.UU. nº 6.287.693. La patente 693 desvela un proceso de cristalización en estado sólido por el cual una composición de morfologías mixtas se forma en partículas de tamaño y forma deseados, y posteriormente cristaliza en el polimorfo más estable de cada uno de los constituyentes respectivos sin pérdida de las características de tamaño/forma de las partículas exponiendo las partículas a un entorno que tiene una alta concentración atmosférica de uno o más disolventes. Las partículas cristalinas formadas resultantes son estables durante el almacenamiento, es decir, pueden envasarse y guardarse como un sólido seco o polvo o como una suspensión en un vehículo acuoso durante periodos prolongados (por ejemplo, al menos aproximadamente un mes) sin pérdida de las características de tamaño/forma deseadas. Debido a que el proceso de cristalización en estado sólido proporciona alta pureza y estabilidad, las partículas de la presente invención pueden fabricarse con o sin excipientes, tampones, estabilizadores, conservantes y biocidas adicionales.

La capacidad para fabricar partículas de tamaño y forma deseados es particularmente ventajosa ya que proporciona un medio para asegurar tamaño de partícula y forma coherente o incluso uniforme, que a su vez garantiza la facilidad de administración (por ejemplo, mediante jeringa hipodérmica), y disolución controlada y predecible y liberación del (de los) agente(s) activo(s). En realizaciones particularmente preferidas, las partículas son microesferas.

Las formulaciones de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía de administración convencional. La vía de administración preferida es administración parenteral, y una vía más preferida es por inyección intramuscular (IM). Cuando se administran por administración parenteral, se prefiere que la formulación se combine como un líquido, bien en disolución o bien como una mezcla tal como una suspensión. Preferentemente, la formulación comprende las microesferas tratadas anteriormente como una suspensión en un vehículo acuoso.

Opcionalmente, la formulación puede combinarse como un polvo para la posterior mezcla con un vehículo y administración. En tales realizaciones, la formulación puede envasarse y comercializarse como parte de un kit. Un kit tal podría comprender dosis unitarias o múltiples dosis de: (1) un polvo que comprende los agentes activos en combinación con excipientes, aditivos, tampones, conservantes y similares; (2) cantidades de dosis unitarias o dosis múltiples de un vehículo líquido, que comprende opcionalmente tampones, conservantes y/o biocidas; y (3) un dispositivo de inyección tal como una jeringa hipodérmica, preferentemente una jeringa de aproximadamente calibre 18 o 20.

Todavía otra opción para la administración de formulaciones de la presente invención es la administración transdérmica. La administración transdérmica de fármacos puede efectuarse por diversos medios que incluyen inyección de un polvo como por un método biolístico en el que las partículas se aceleran por un gas u otro medio para pasar a través de la piel. Un ejemplo de un enfoque tal se describe en las patentes de EE.UU. nº 6.168.587 titulada "Needleless syringe using supersonic gas flow for particle delivery"; y 6.475.181 titulada "Drug Particle Delivery".

Similarmente, la administración transdérmica puede lograrse más pasivamente como por parches adhesivos aplicados a la piel durante periodos prolongados. Tales parches se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.149.935 titulada "Solid matrix system for transdermal drug delivery".

Las formulaciones de la presente invención pueden administrarse eficazmente a cualquier organismo mamífero tal como un organismo primate, canino, felino, ovino, equino, porcino, bovino o murino. Preferentemente, el sujeto es un organismo primate, y todavía más preferentemente es un ser humano femenino. Se entenderá que el estrógeno y la progestina particulares utilizados en las formulaciones para diferentes mamíferos pueden variar, al igual que las cantidades.

La formulación que contiene microesferas de la presente invención puede prepararse usando cualquier método adecuado. En una realización preferida, las microesferas se preparan calentando E2 y/o P4 y luego enfriando rápidamente de manera que las microesferas cristalicen suficientemente. Posterior a la cristalización, las cápsulas

pueden recogerse por filtración basándose en el tamaño de partícula.

Generalmente, las microesferas de mayor tamaño disminuyen la máxima concentración de las hormonas y el tiempo requerido para alcanzar la concentración. Adicionalmente, microesferas de mayor tamaño aumentan la semivida de absorción de hormonas.

También se describe en el presente documento un kit para su uso en terapia anticonceptiva/de sustitución hormonal. El kit puede comprender una formulación según la invención, que comprende una cantidad eficaz anticonceptiva y eficaz para sustitución hormonal de 17-β-estradiol y progesterona. El kit puede comprender además uno o más componentes adicionales tales como una ampolla estéril que comprende un vehículo acuoso para reconstituir la formulación en una suspensión homogénea, si la formulación se proporciona en microesferas en forma de polvo estéril. Además, el kit puede incluir medios para administrar la formulación tales como, por ejemplo, jeringas con agujas de calibre 18 y/o 20 para inyección intramuscular.

Se contempla que las composiciones de la presente invención pueden formularse y administrarse según el siguiente protocolo. Se prepara una formulación de microesferas que comprende 9 mg de E2/400 mg de P4 como un polvo estéril en el que las microesferas oscilan en tamaño de aproximadamente 35 μm a aproximadamente 75 μm, preferentemente aproximadamente 39 μm a aproximadamente 52 μm. En ciertas realizaciones preferidas, el polvo está envasado en seco en jeringas de dosis unitaria. Se prefieren jeringas de agujas de calibre aproximadamente 18 o 20 para inyección intramuscular. Las jeringas se envasan preferentemente en envases estériles herméticos y se guardan bajo condiciones ambientales a aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C.

La formulación en polvo previamente envasada puede suspenderse en un vehículo acuoso. En una realización preferida, el vehículo acuoso se toma de una ampolla estéril que contiene 3,0 ml de un vehículo acuoso. Un vehículo acuoso preferido usado para suspender las microesferas está compuesto por:

Metilparabeno NF	4,11 mg
Propilparabeno NF	0,45 mg
Manitol NF	144 mg
Carboximetilcelulosa de sodio, USP, baja viscosidad	2,25 mg
Polisorbato 80 NF	0,60 mg
Agua para inyección USP	3,00 mg

Un experto habitual en la materia entenderá que la composición y concentraciones relativas de un vehículo acuoso tal no son críticas para la presente invención, y así ambas pueden variarse sin alterar o disminuir sustancialmente las ventajas o utilidad de la presente invención.

La reconstitución puede efectuarse por agitación vigorosa hasta que se obtenga una suspensión homogénea. La suspensión resultante se administra preferentemente por inyección intramuscular profunda, por ejemplo, en la región glútea. La primera dosis debe administrarse en los cinco primeros días desde el inicio de la última menstruación. Las dosis posteriores deben administrarse en un programa de cada 28 ± 3 días. Para facilidad y comodidad, las dosis posteriores pueden administrarse en regiones glúteas alternas.

Una formulación farmacéutica que comprende microesferas de progesterona y microesferas de estradiol y colesterol produjo un efecto anticonceptivo fiable. Véase el Ejemplo 1, artículo de prueba B, más adelante. Un inconveniente reconocido de las formulaciones anticonceptivas parenterales que contienen estradiol es su alta solubilidad en disoluciones acuosas. Las microesferas que contienen estradiol pueden formularse por tratamiento después de la fabricación o atemperado de las microesferas. Es decir, las microesferas se forman primero en el tamaño y forma deseados, se someten a un tratamiento o etapa de atemperamiento en una atmósfera controlada, y a continuación se secan y/o recuperan. Dependiendo del tratamiento, las microesferas de EC tienen una tasa de disolución de estradiol en disolución acuosa durante 24 horas de aproximadamente el 20 % o menos, y preferentemente aproximadamente el 15 % o menos. Realizaciones más preferidas proporcionan tasas de disolución de aproximadamente el 10 % o menos; y todavía más preferidas son aquellas que tiene una tasa de disolución de estradiol de aproximadamente el 6 % o menos.

La tasa de disolución de estradiol (EDR) es una medida de la cantidad de estradiol disuelta en una disolución acuosa del 0,3 % en peso/volumen de monooleato de polioxietilensorbitano (Tween 80®) en agua purificada USP durante 24 horas a 37 °C y presión estándar.

La producción de partículas que tienen baja EDR facilita la preparación de una formulación farmacéutica para terapia de sustitución hormonal (HRT) que contiene muy baja concentración de estradiol. Tales composiciones de baja concentración de estradiol son muy adecuadas para pacientes en necesidad de HRT durante los cinco primeros años de la menopausia. Además, las formulaciones que tienen baja EDR facilitan una pauta de tratamiento que implica menos ciclos, o de menor frecuencia, de administración. Se contempla que las formulaciones de la presente invención pueden administrarse con tan poca frecuencia como mensualmente o cada dos meses.

Estudios de difracción de rayos X de las partículas que demuestran tales bajas tasas de disolución de estradiol sugieren que las partículas son agregados moleculares con una composición semicristalina que comprende tanto un componente amorfo como uno cristalino. Las composiciones de baja EDR son aquellas en las que el estradiol consiste en aproximadamente del 45 % a aproximadamente el 65 % de componente amorfo, y aproximadamente del 35 % a aproximadamente el 55 % de componente cristalino. Preferentemente, las partículas son aproximadamente el 50-60 % de componente amorfo y aproximadamente el 40-50 % de componente cristalino. Más preferentemente, las partículas son aproximadamente el 55 % de componente amorfo y aproximadamente el 45 % de componente cristalino. Estas composiciones de baja EDR se formulan preferentemente a partir de una mezcla de una relación molar 1:1 de estradiol:colesterol.

Sin desear quedar ligado a teoría o principio científico alguno, los solicitantes creen que la solubilidad reducida y el menor perfil de disolución son atribuibles a la orientación del componente amorfo y el componente cristalino dentro del agregado molecular o material compuesto molecular. Es decir, se contempla que la superficie exterior de la partícula comprenda predominantemente el componente amorfo de forma que las moléculas de estradiol orienten una porción predominantemente hidrófoba de la molécula hacia el disolvente, haciendo así las partículas sustancialmente insolubles en agua.

Las partículas de estradiol de liberación lenta pueden formularse combinando estradiol y colesterol en una relación molar 1:1, fabricando la composición en partículas del tamaño y forma deseado, y sometiendo a una atmósfera saturada de disolvente durante un periodo prolongado a temperatura elevada, y posteriormente, secando las partículas a temperatura elevada. En una realización, las partículas fabricadas se exponen a una atmósfera de baja humedad relativa (HR) durante aproximadamente 12 horas o más antes de la exposición a la atmósfera saturada de disolvente. Preferentemente, las partículas se formulan como microesferas.

Las microesferas que tienen una EDR de aproximadamente el 15 % o menos pueden formularse: creando partículas que consisten esencialmente en una relación molar 1:1 de estradiol y colesterol en las que cualquiera de ellas o ambas están en una forma amorfa o polimorfa; exponiendo las partículas a una atmósfera de aproximadamente el 25 % de humedad relativa (HR) o menos durante al menos aproximadamente 12 horas; exponiendo las partículas a una atmósfera saturada con acetona y agua durante al menos aproximadamente 48 horas a aproximadamente 50 °C a aproximadamente 65 °C; secando las partículas a aproximadamente 35 °C a aproximadamente 50 °C durante aproximadamente 24 horas o más; y recuperando dichas partículas; en las que la EDR de las partículas recuperadas es inferior a aproximadamente el 15 % (en peso) durante 24 horas.

Más preferentemente, el método implica crear partículas que consisten esencialmente en estradiol y colesterol en las que cualquiera de ellos o ambos están en una forma amorfa o polimorfa; exponer dichas partículas a una atmósfera de baja HR durante aproximadamente 24 horas; exponer las partículas a una atmósfera saturada con acetona y agua durante aproximadamente 72 horas a aproximadamente 60 °C; secar las partículas a aproximadamente 45 °C durante aproximadamente 42 horas; y recuperar dichas partículas; en las que la tasa de disolución de estradiol de las partículas recuperadas en disolución acuosa es inferior a aproximadamente el 6 % (en peso) durante 24 horas.

Las concentraciones relativas de acetona y agua que saturan la atmósfera son de aproximadamente el 65 % en moles a aproximadamente el 80 % en moles, y aproximadamente el 20 % en moles a aproximadamente el 35 % en moles, respectivamente. Preferentemente, las concentraciones relativas son de aproximadamente el 70 % en moles a aproximadamente el 75 % en moles de acetona; y aproximadamente el 25 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles de agua. Lo más preferentemente, las concentraciones de los dos componentes son aproximadamente del 72 % en moles de acetona a aproximadamente el 28 % en moles de agua. El entorno de baja humedad relativa es aproximadamente del 25 % de HR o menos; y preferentemente, aproximadamente del 20 % o menos.

Alternativamente, las partículas que tienen una EDR de aproximadamente el 20 % o menos pueden formularse por exposición en serie a una atmósfera que contiene acetona/agua y a una atmósfera que contiene etanol/agua. Ese método implica: (a) crear partículas que consisten esencialmente en estradiol y colesterol en aproximadamente una relación molar 1:1 en las que cualquiera de ellos o ambos están en una forma amorfa o polimorfa; (b) exponer dichas partículas a una atmósfera saturada con acetona y agua; (c) repetir la etapa (b) al menos una vez, y preferentemente dos veces; (d) exponer dichas partículas a una atmósfera saturada con etanol y agua; (e) secar las partículas; y (f) recuperar dichas partículas; en las que la tasa de disolución de estradiol de las partículas recuperadas en disolución acuosa es inferior a aproximadamente el 20 % (en peso) durante 24 horas.

En realizaciones preferidas, se exponen partículas a vapores de una mezcla de acetona/agua durante aproximadamente dos a aproximadamente cinco etapas consecutivas de al menos aproximadamente 12 horas a aproximadamente 20 °C - 40 °C. Preferentemente, la etapa de acetona/agua se realiza en tres etapas consecutivas durante aproximadamente 24 horas a aproximadamente 30 °C.

La concentración relativa de la mezcla de acetona/agua es como se ha descrito anteriormente; y la mezcla de etanol/agua es una concentración relativa de aproximadamente el 95 % en moles a aproximadamente el 99 % en moles de etanol; y aproximadamente el 5 % en moles a aproximadamente el 1 % en moles de agua. Las partículas pueden secarse a aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C, preferentemente aproximadamente 45 °C,

durante aproximadamente 24 horas o más, y preferentemente aproximadamente 36 horas. Las etapas de secado descritas aquí y anteriormente pueden realizarse a vacío o en aire.

Más preferentemente, el método alternativo implica: crear partículas que consisten esencialmente en estradiol y colesterol en aproximadamente una relación molar 1:1 en las que cualquiera de ellos o ambos están en una forma amorfa o polimorfa; exponer dichas partículas a una atmósfera saturada con acetona y agua a aproximadamente 30 °C durante tres etapas consecutivas de aproximadamente 24 horas; exponer dichas partículas a una atmósfera saturada con etanol y agua durante aproximadamente dos horas a aproximadamente 30 °C; secar las partículas a aproximadamente 45 °C durante aproximadamente 42 horas; y recuperar dichas partículas; en las que la tasa de disolución del estradiol de las partículas recuperadas en disolución acuosa es inferior a aproximadamente el 20 % (en peso) durante 24 horas.

Los métodos anteriores proporcionan medios para fabricar microesferas de estradiol y colesterol que tienen una EDR inferior a aproximadamente el 20 % (en peso). Las realizaciones preferidas tienen una EDR de aproximadamente el 15 % o menos, y más preferentemente aproximadamente el 6 % o menos. El estradiol de las microesferas en una formulación de la presente invención está en una forma semicristalina o compuesta en la que aproximadamente el 50-60 % es amorfa y aproximadamente el 40-50 % es cristalina. Realizaciones preferidas son aquellas en las que el estradiol es aproximadamente el 55 % amorfo y aproximadamente el 45 % cristalino.

Las partículas de estradiol/colesterol de baja EDR de los anteriores métodos pueden combinarse con progesterona para preparar formulaciones de estradiol de baja dosis que pueden administrarse mensualmente o menos frecuentemente. Por ejemplo, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg de 17-β-estradiol mezclados con colesterol en aproximadamente una relación molar 1:1, y aproximadamente 300 a aproximadamente 400 mg de progesterona; en la que la relación de peso de 17-β-estradiol con respecto a progesterona es aproximadamente 1:40, el 17-β-estradiol consiste en una forma semicristalina que es aproximadamente el 50-60 % amorfa y aproximadamente el 40-50 % cristalina, y la EDR de la formulación es aproximadamente el 20 % o menos. La formulación puede prepararse a partir de partículas de estradiol/colesterol en combinación con partículas de progesterona. Las partículas son preferentemente microesferas. Las partículas pueden incluir adicionalmente aditivos y excipientes, tales como lubricantes, tampones, estabilizadores y similares. Adicionalmente, las partículas pueden suspenderse en un vehículo para administración parenteral. Aquellas formulaciones tienen un efecto anticonceptivo y pueden usarse eficazmente en pautas de sustitución hormonal que implican la administración parenteral una vez al mes o incluso cada dos meses. Preferentemente, la formulación se administra por inyección intramuscular.

35 **EJEMPLO 1**

ESTUDIO FARMACOCINÉTICO EN CONEJOS PARA EVALUAR LA BIODISPONIBILIDAD DE DIFERENTES COMBINACIONES DE MICROESFERAS DE PROGESTERONA Y MICROESFERAS DE ESTRADIOL Y MICROESFERAS A DIFERENTES RELACIONES DE ESTRADIOL CON RESPECTO A COLESTEROL

Este estudio pretende evaluar el perfil farmacocinético de artículos de prueba que contienen progesterona (P) y 17-β-estradiol (E). Se realizó un estudio prospectivo y comparativo en conejos macho de Nueva Zelanda. Los artículos de prueba consistieron en suspensiones acuosas usando el vehículo acuoso descrito anteriormente de microesferas de progesterona + microesferas de estradiol (E) o estradiol-colesterol (EC), fabricadas por el siguiente el proceso descrito en la patente de EE.UU. nº 5.360.616 y cristalizadas según la patente de EE.UU. nº 6.528.094 B1. Los artículos de prueba evaluados son los siguientes:

Artículo de prueba	Composición
A	Microesferas (ME) de P + ME de E
B	ME de P + (1:1) ME de estradiol-colesterol
C	ME de P + (2:1) ME de estradiol-colesterol
D	ME de P + (3:1) ME de estradiol-colesterol

Las suspensiones acuosas se administraron en forma de inyecciones intramusculares (IM). Cada conejo recibió 133 mg de progesterona y 3 mg de estradiol. Se recogieron muestras de sangre en el momento 0 (predosis), 1, 2, 4 y 9 horas, y cada día desde el día 2 a 14, y cada dos días desde el día 14 a 28. Las muestras resultantes se ensayaron para progesterona y estradiol por radioinmunoensayo (RIA).

De los perfiles plasmáticos, se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos: Área bajo la curva hasta el infinito (ABC_INF), área bajo la curva hasta el último tiempo de muestreo (ABC0_t), concentración plasmática máxima (C_{máx}), tiempo hasta alcanzar la C_{máx} (T_{máx}), semivida (t₂), constante de eliminación (K_e) y tiempo de residencia medio (TRM). Estos resultados se analizaron estadísticamente con el objetivo de evaluar cualquier posible diferencia entre grupos.

Con respecto a la comparación de los parámetros calculados para estradiol, aunque el análisis no mostró evidencia de ninguna posible diferencia estadísticamente significativa (p<0,05) en estos parámetros entre los grupos, como se

muestra en la siguiente tabla, hay diferencias en el TRM entre los grupos ya que el TRM para ME de EC (1:1) (artículo de prueba B) fue casi dos veces mayor que para las microesferas de E (artículo de prueba A), como se observa en la siguiente tabla:

	ARTÍCULO DE PRUEBA			
	A	B	C	D
TRM (días)	4,56 √ 1,05	8,33 √ 2,61	5,01 √ 0,55	6,40 √ 2,27
CV	23,3	31,3	11	35,5
n	4	4	4	4

5 Con respecto a la comparación de los parámetros calculados para progesterona, aunque se observó variabilidad en los parámetros calculados, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupos.

10 Análisis gráfico:

Los perfiles plasmáticos medios para estradiol y progesterona para los cuatro artículos de prueba evaluados se muestran en las Figuras 1 y 2. Según los resultados para estradiol y progesterona, aunque el análisis estadístico no mostró evidencia de diferencia entre grupos, el análisis gráfico de perfiles plasmáticos (véase la Figura 1) mostró diferente comportamiento. Esto puede ser atribuible al pequeño tamaño de muestra.

15 EJEMPLO 2 (COMPARATIVO)

Microesferas de una mezcla de 49 % de 17- β -estradiol y 51 % de colesterol

20 Este ejemplo comparativo es análogo a la fabricación de partículas según el Ejemplo 7 de la patente de EE.UU. nº 6.528.094 B1 (también denominado en el presente documento "proceso de cristalización A"). Las microesferas de estradiol/colesterol pueden combinarse con microesferas de progesterona para producir la formulación farmacéutica del artículo de prueba B del Ejemplo 1, anterior.

25 Las microesferas de esta mezcla se obtuvieron fundiendo juntos los componentes y, en cuanto a las sustancias puras, se pulverizaron en gotitas y se solidificaron en microesferas. Las microesferas mostraron inicialmente un alto contenido amorfo.

30 Cuando las microesferas se dispusieron en un recipiente de aproximadamente 7 litros y se expusieron durante 24 horas a 30 °C a los vapores de 8 ml de etanol mantenido en un material de celulosa poroso, las microesferas inicialmente amorfas cristalizaron completamente en presencia de los vapores.

Las microesferas se secaron a 60 °C en un vacío durante 24 horas, y el etanol residual presente en las microesferas fue inferior al 0,01 %.

35 Para evaluar la estabilidad de las microesferas, las microesferas no cristalizadas (solidificado el fundido solo) y las microesferas según la presente invención se dispusieron por separado en disolución acuosa a 40 °C, y se observaron por microscopía óptica después de 82 días. Como se ha observado por microscopía óptica, las microesferas cristalizadas según la presente invención siguieron siendo estables con el tiempo cuando se dispusieron en agua, pero no las microesferas no cristalizadas.

45 Las microesferas resultantes cristalizadas fueron morfológicamente estables durante 82 días cuando se dispusieron en una disolución de 0,01 % de polisorbato 80 en agua purificada USP a 40 °C, o durante 14 días cuando se inyectaron intramuscularmente en conejos.

La Figura 3 muestra el difractograma de rayos X de microesferas de EC (40:60) antes y después de la cristalización; y la Figura 4 muestra el perfil de disolución correspondiente (es decir, 74 % de estradiol disuelto a las 24 horas en una disolución acuosa de 0,3 % de Tween 80®).

50 EJEMPLO 3

Proceso de cristalización modificado para ME de EC que presentan 20 % de disolución durante 24 horas ("proceso de cristalización B")

55 Se fabricaron microesferas de estradiol-colesterol (1:1) como en el Ejemplo 2, anteriormente. Las microesferas, que tienen un alto contenido amorfo, se expusieron a vapores de acetona y agua (95 % en moles de acetona: 5 % en moles de agua) durante tres etapas de 24 horas consecutivas a 30 °C. Entre etapas, los recipientes herméticos se abren y el contenido se seca con aire, se elimina el disolvente residual y a continuación se envían las microesferas de estradiol a la siguiente etapa de exposición a vapor.

60

A continuación, las partículas se calentaron (desecharon) a 45 °C durante 42 horas a vacío (aproximadamente 12,2 in. de Hg).

Las partículas resultantes produjeron una EDR promedio de aproximadamente el 20 %. Véase la Figura 5.

5

EJEMPLO 4

Proceso de cristalización para disolución ultra-baja de microesferas de estradiol-colesterol ("proceso de cristalización C")

10

Se fabricaron microesferas de estradiol-colesterol según el proceso del Ejemplo 2. Las partículas se almacenaron bajo humedad relativa baja durante 24 horas. A continuación, las partículas se expusieron a vapores de acetona y agua (72 % en moles de acetona/28 % en moles de agua) durante 72 horas a 60 °C. A continuación, las partículas se calentaron (para la desecación) a 45 °C durante 42 horas.

15

Las partículas resultantes tuvieron un promedio de aproximadamente el 5 % de disolución de estradiol durante 24 horas en una disolución acuosa del 0,3 % de monooleato de polioxietilensorbitano (Tween 80®) a temperatura y presión estándar.

20

La Figura 19 ilustra el perfil de disolución de las partículas de este ejemplo en comparación con aquellas resultantes de los métodos de los Ejemplos 2 y 3.

La Figura 20 muestra el perfil de DSC de las partículas resultantes de este ejemplo.

25

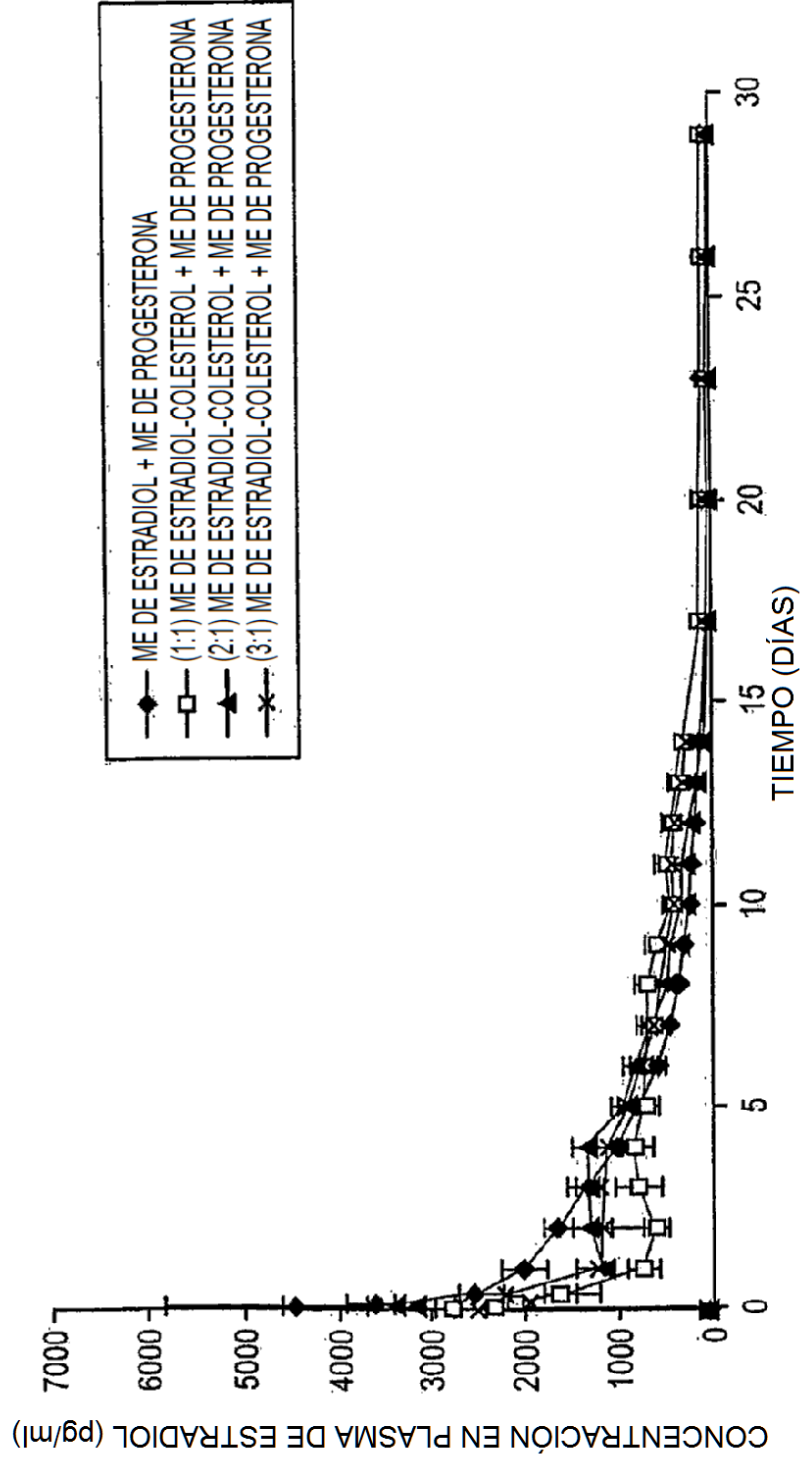
Las Figuras 21 y 22 son difractogramas de rayos X de las partículas resultantes del Ejemplo 4

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación que tiene efectos anticonceptivos y de sustitución hormonal en un mamífero hembra que comprende microesferas de 17- β -estradiol y colesterol, y microesferas de progesterona, en la que el 17- β -estradiol es del 45 al 65 % amorfo y del 35 al 55 % cristalino, y en la que la formulación tiene una tasa de disolución de estradiol (EDR) del 20 % o menos.
2. Una formulación según la reivindicación 1, en la que la EDR es del 10 % o menos.
- 10 3. Una formulación según la reivindicación 1, en la que la EDR es del 6 % o menos.
4. Una formulación según la reivindicación 1, que comprende 5 a 15 mg de 17- β -estradiol y 200 a 500 mg de progesterona.
- 15 5. Una formulación según la reivindicación 1, que comprende 5 a 15 mg de 17- β -estradiol y 300 a 500 mg de progesterona.
- 20 6. Una formulación según la reivindicación 1, en la que el 17- β -estradiol y el colesterol están en mezcla en una relación molar 1:1.
7. Una formulación según la reivindicación 1, en la que la relación de peso de 17- β -estradiol con respecto a progesterona es 1:40.
- 25 8. Una formulación según la reivindicación 1, en la que la relación de peso de 17- β -estradiol con respecto a progesterona es 9:400.
9. Una formulación según la reivindicación 1, en la que el 17- β -estradiol es del 50 al 60 % amorfo y del 40 al 50 % cristalino.
- 30 10. Una formulación según la reivindicación 1, en la que el 17- β -estradiol es 55 % amorfo y 45 % cristalino.
11. Una formulación según la reivindicación 1, que se formula para administración por inyección intramuscular.
- 35 12. Una formulación según la reivindicación 1, en la que las microesferas de 17- β -estradiol y colesterol, y las microesferas de progesterona, tienen diámetros entre 25 μ m y 125 μ m.
13. Una formulación según la reivindicación 1, en la que las microesferas de 17- β -estradiol y colesterol, y las microesferas de progesterona, tienen diámetros entre 35 μ m y 75 μ m.
- 40 14. Una formulación que comprende partículas de 17- β -estradiol y colesterol, y partículas de progesterona, y en la que el 17- β -estradiol y la progesterona están en una relación de peso de 3:40 a 1:100 y en la que el 17- β -estradiol es del 45 al 65 % amorfo y del 35 al 55 % cristalino, y en la que la formulación tiene una tasa de disolución de estradiol (EDR) del 20 % o menos, para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra.
- 45 15. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 14, en la que la formulación se formula para la administración repetida después de un ciclo menstrual completo del sujeto.
16. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 14, en la que la formulación se formula para administración por inyección intramuscular.
- 50 17. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 14, en la que las partículas de formulación son microesferas que tienen un diámetro de entre 35 μ m y 75 μ m.
18. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 14, en la que la relación de peso de 17- β -estradiol con respecto a progesterona es 1:40.
- 55 19. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 14, en la que la relación de peso de 17- β -estradiol con respecto a progesterona es 9:400.
- 60 20. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 14, en la que el 17- β -estradiol es 50-60 % amorfo y 40-50 % cristalino.
- 65 21. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 20, en la que la formulación tiene una EDR del 10 % o menos

22. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 20, en la que la formulación tiene una EDR del 6 % o menos.
- 5 23. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 20, en la que la formulación comprende 5 a 15 mg de 17- β -estradiol y 300 a 500 mg de progesterona
24. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 20, en la que el 17- β -estradiol de la formulación es 55 % amorfo y 45 % cristalino.
- 10 25. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 20, en la que la formulación se formula para administración por inyección intramuscular.
26. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 20, en la que la formulación se formula para administración una vez al mes o menos frecuentemente.
- 15 27. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 20, en la que la formulación se formula para administración una vez cada dos meses.
28. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 20, en la que el mamífero es un ser humano.
- 20 29. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 20, en la que el 17- β -estradiol y el colesterol están en mezcla en una relación molar 1:1.
- 25 30. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 20, en la que la relación de peso de 17- β -estradiol con respecto a progesterona es 1:40.
31. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 20, en la que la relación de peso de 17- β -estradiol con respecto a progesterona es 9:400.
- 30 32. La formulación para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra según la reivindicación 20, en la que las partículas de 17- β -estradiol y colesterol, y las partículas de progesterona, tienen diámetros entre 25 μm y 125 μm .
- 35 33. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso en anticoncepción en un mamífero hembra.
34. Una formulación como se ha especificado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso en terapia de sustitución hormonal en un mamífero hembra en los cinco primeros años de la menopausia.

PERFIL PLASMÁTICO MEDIO DE ESTRADIOL. ESCALA ARITMÉTICA
ESTUDIO N° BIO 2002 01
PERFIL PLASMÁTICO DE ESTRADIOL ± ERROR ESTÁNDAR



n = 4 conejos por artículo de prueba

FIG. 1

PERFIL PLASMÁTICO MEDIO DE PROGESTERONA. ESCALA ARITMÉTICA
ESTUDIO N° BIO 2002 01
PERFIL PLASMÁTICO MEDIO DE PROGESTERONA ± ERROR ESTÁNDAR

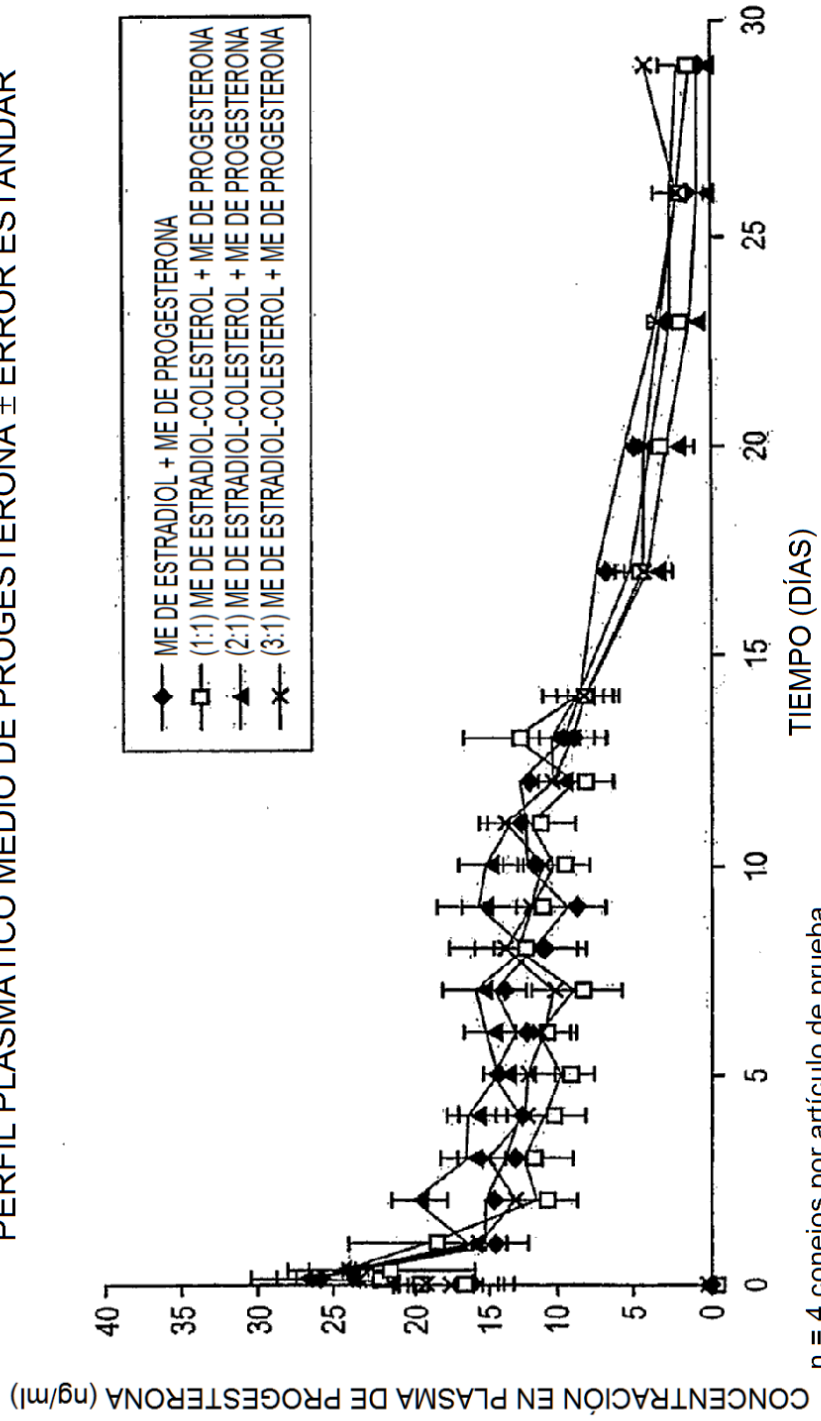


FIG. 2

DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS X
(40:60) MICROESFERAS DE ESTRADIOL-COLESTEROL ANTES DE LA CRISTALIZACIÓN.

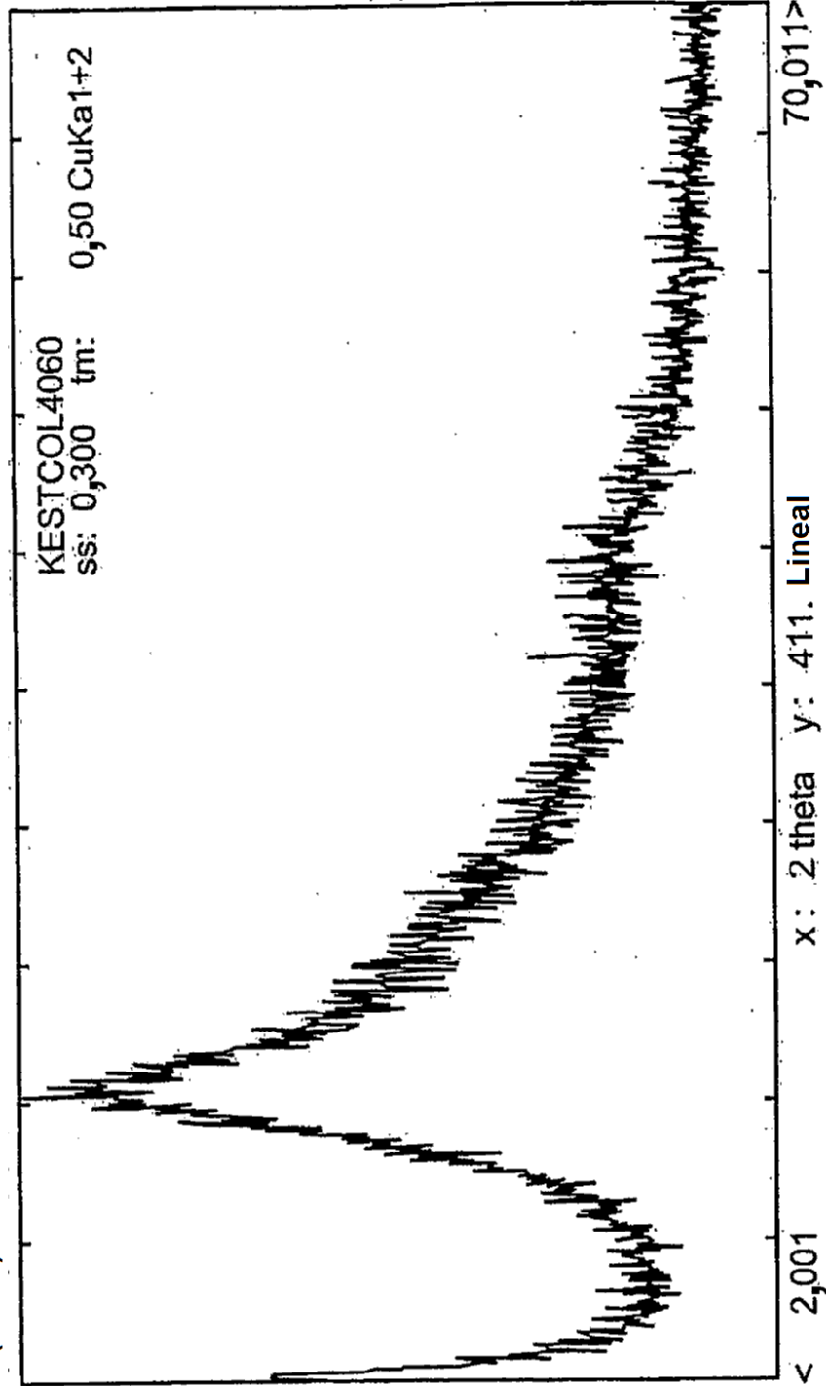


FIG. 3A

DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS X
(40:60) MICROESFERAS DE ESTRADIOL-COLESTEROL ANTES DE LA CRISTALIZACIÓN.

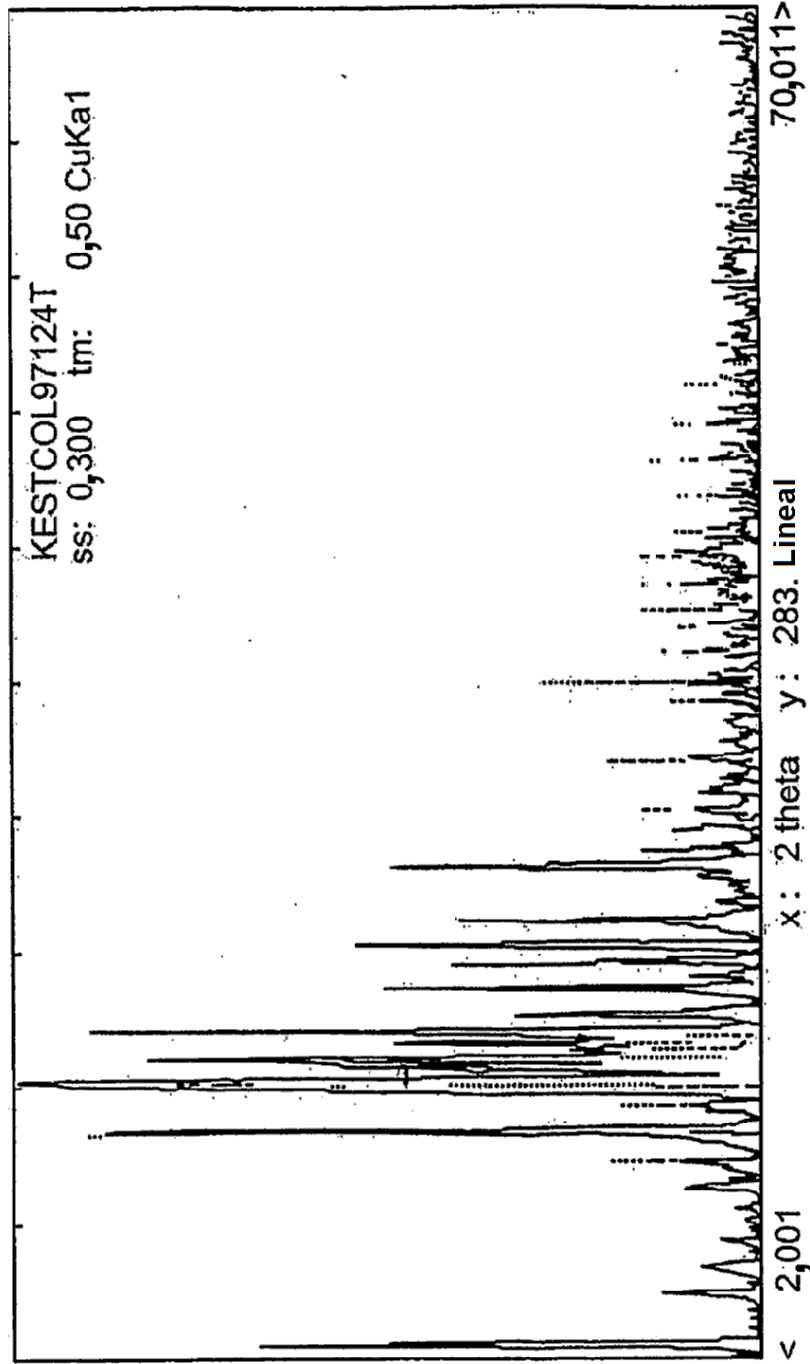


FIG. 3B

PERFIL DE DISOLUCIÓN DE (60:40) M DE EC CRISTALIZADAS CON VAPORES

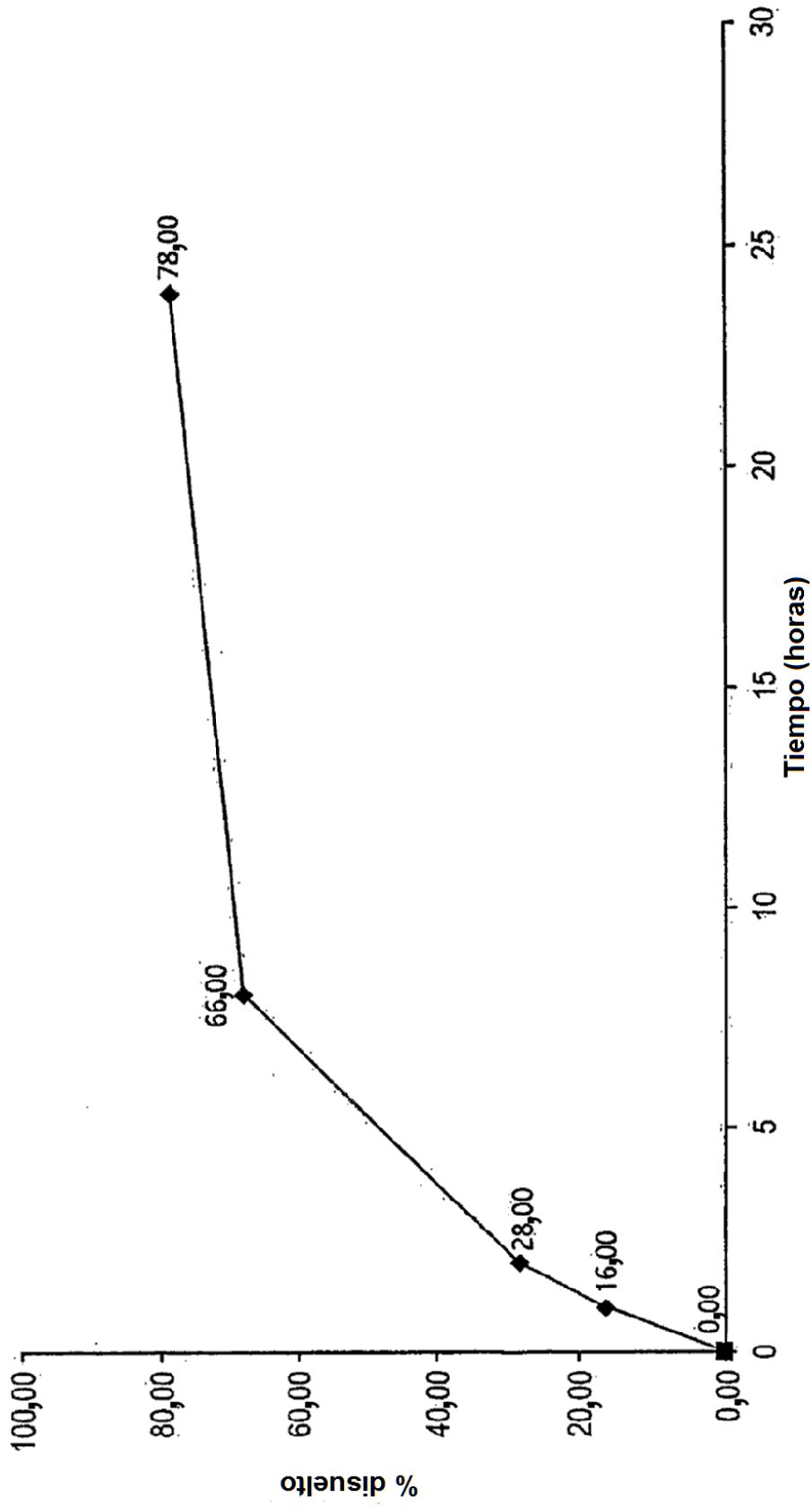


FIG. 4

PERFILES DE DISOLUCIÓN COMPARATIVOS DE (1:1) M DE EC PREPARADAS POR EL PROCESO A Y B.

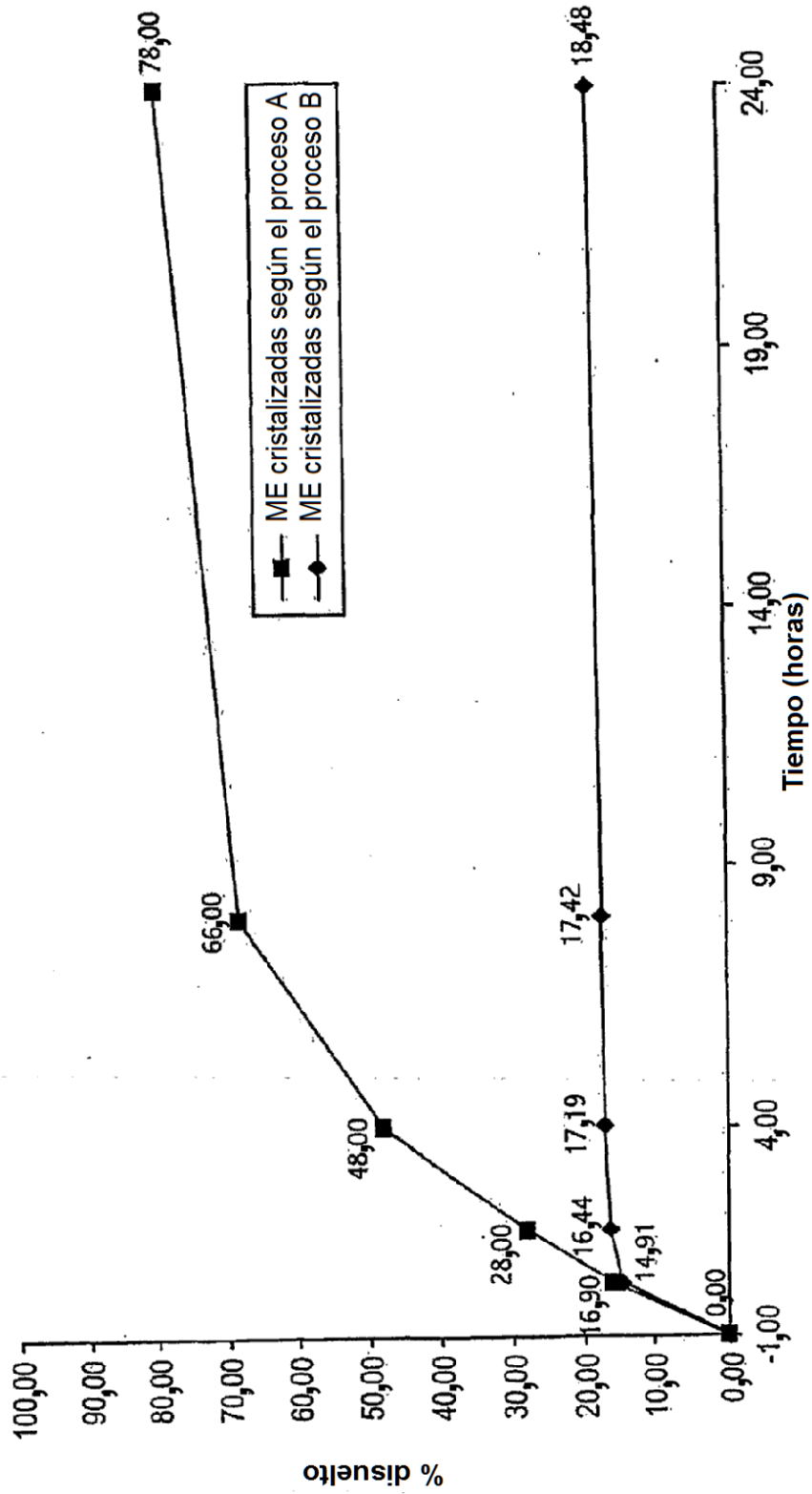


FIG. 5

MICROESFERAS DE ESTRADIOL-COLESTEROL (1:1) PREPARADAS SEGÚN EL PROCESO B

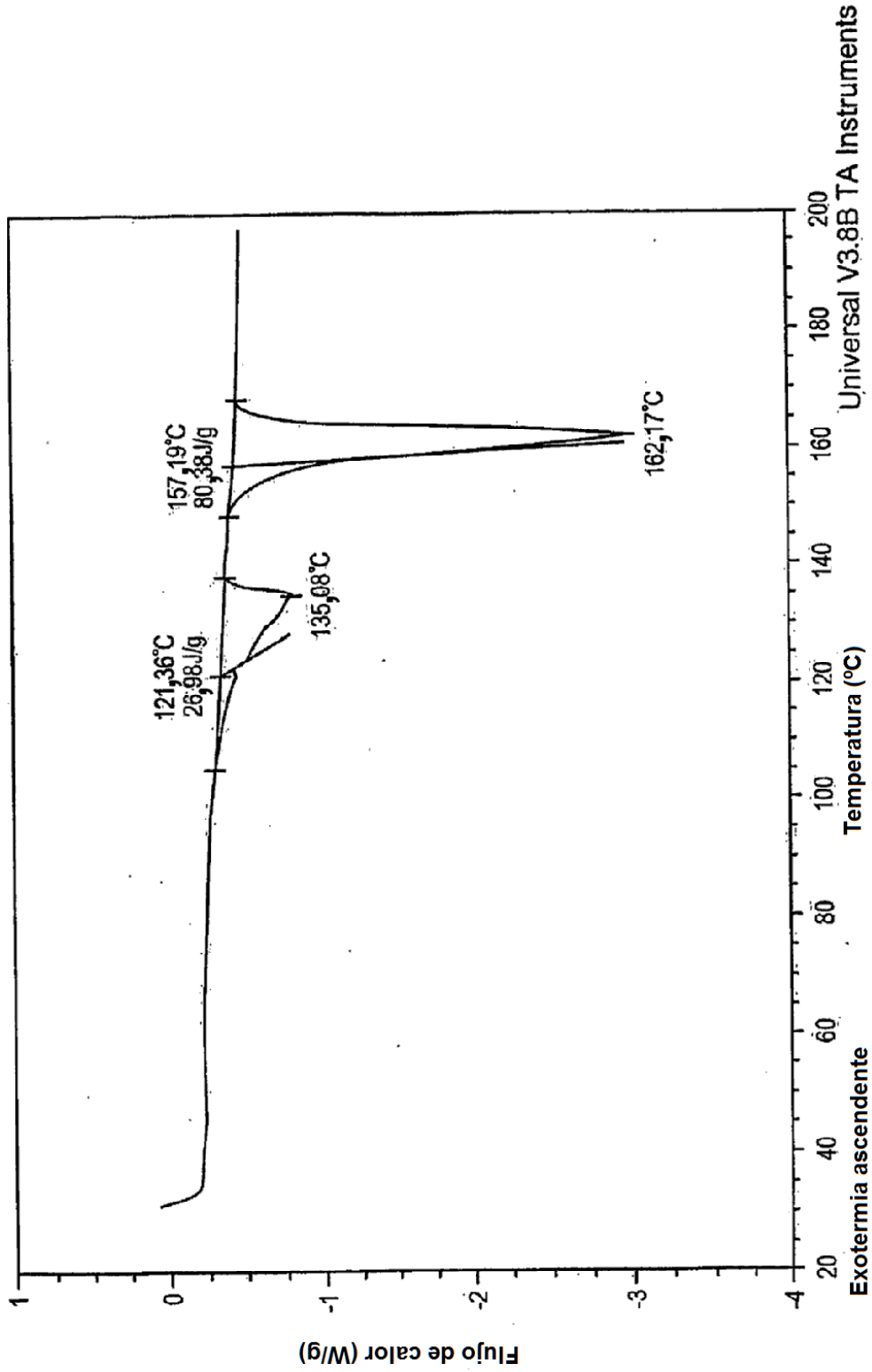


FIG. 6

PERFILES DE DISOLUCIÓN COMPARATIVOS DE E Y (1:1), (2:1) Y (3:1) M DE EC
USADOS EN EL ESTUDIO CLÍNICO ANTICONCEPTIVO

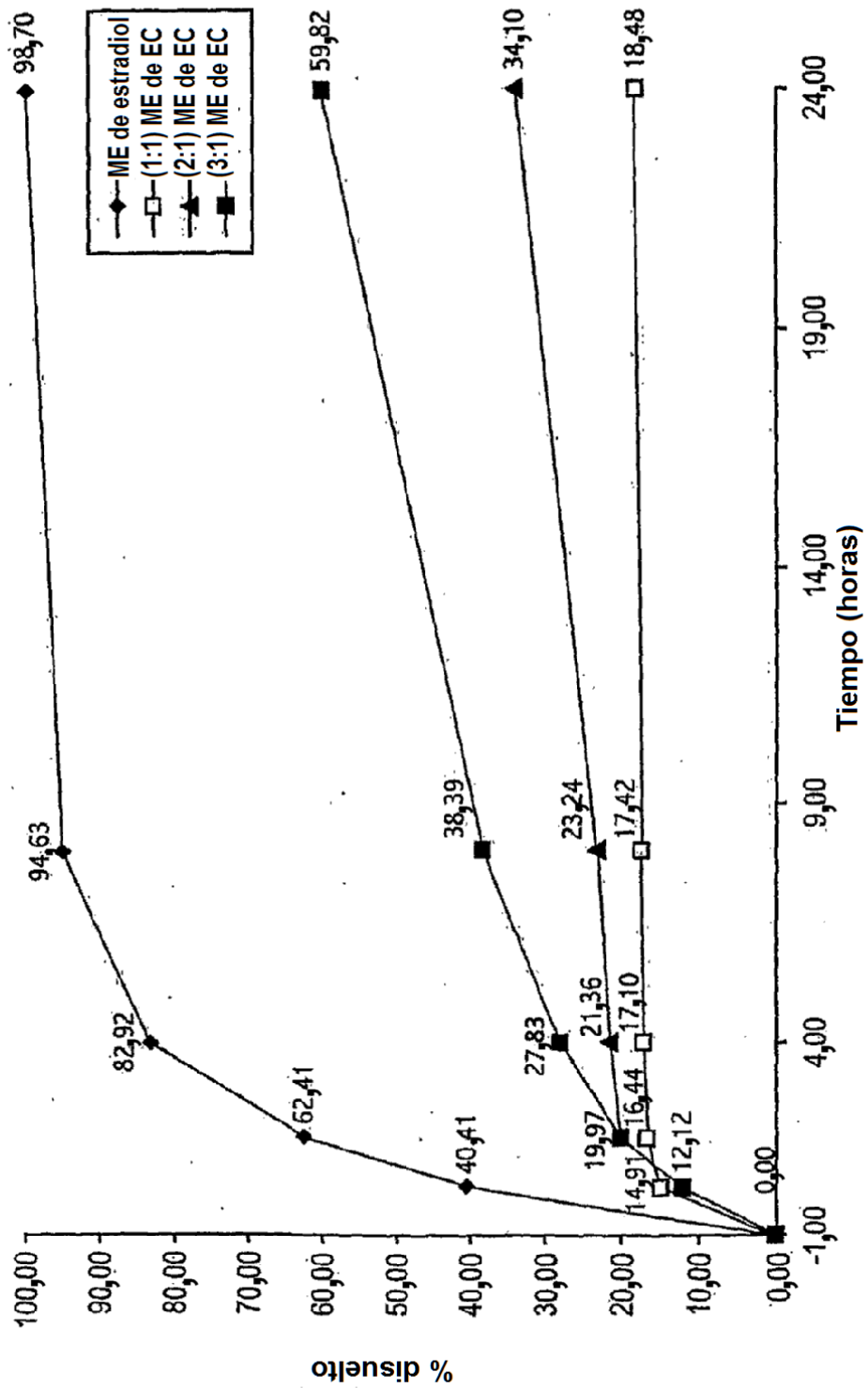


FIG. 7

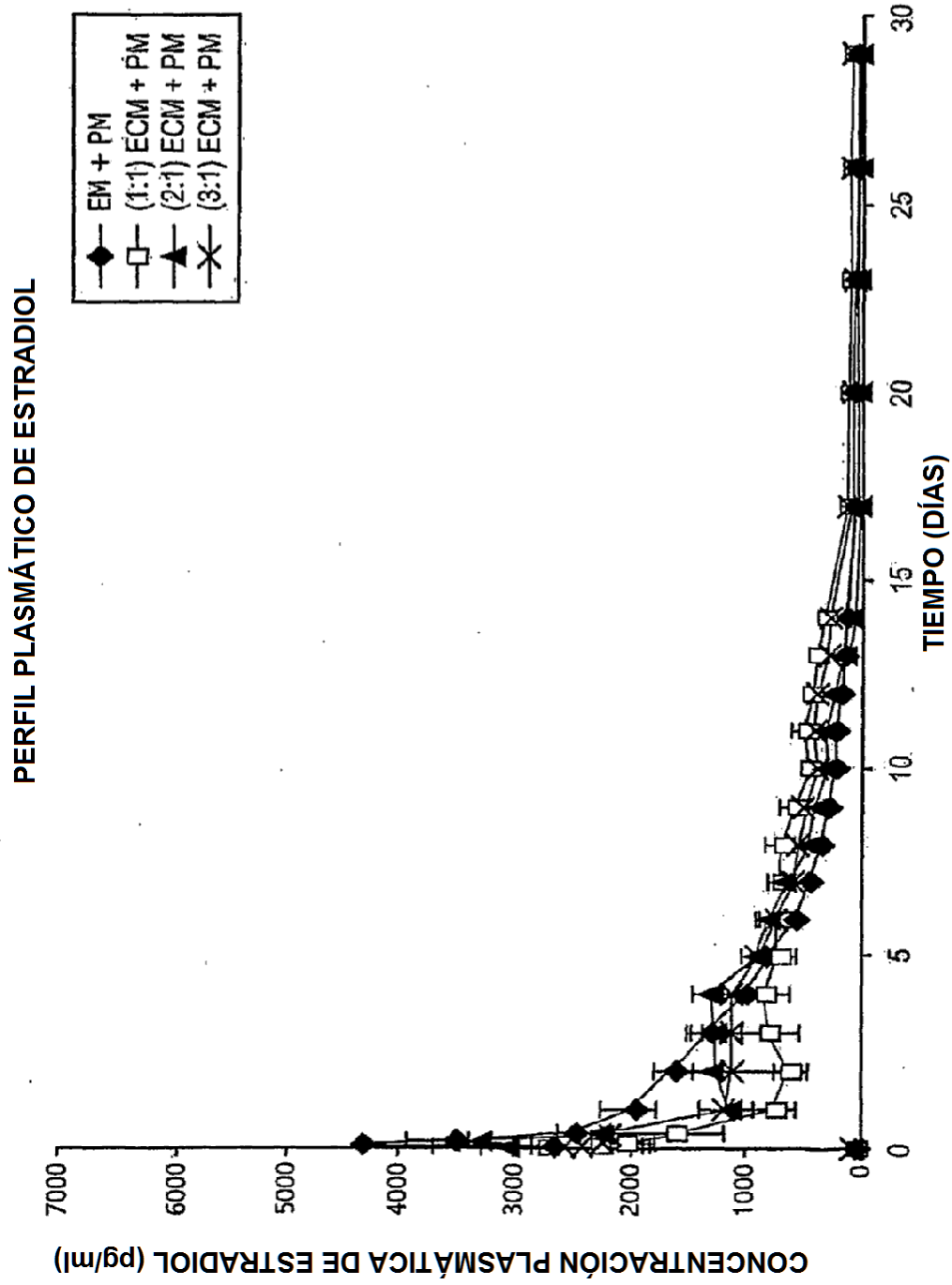
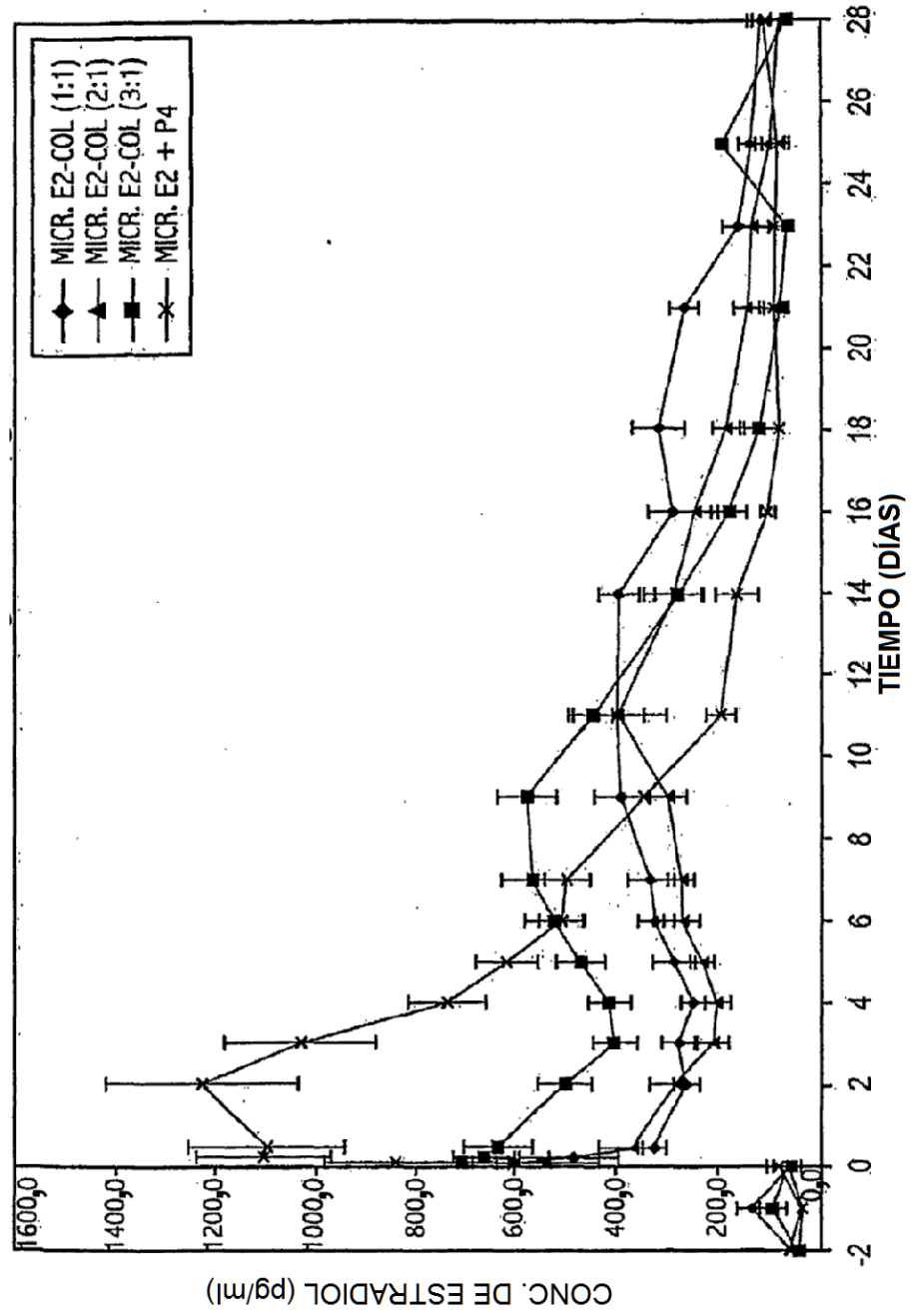


FIG. 8

PERFIL PLASMÁTICO DE
ESTRADIOL
ESTUDIO CLÍNICO 0103//APL
MEDIA ± E.E. n = 10
DOSIS: E2 9 mg + P4 400 mg

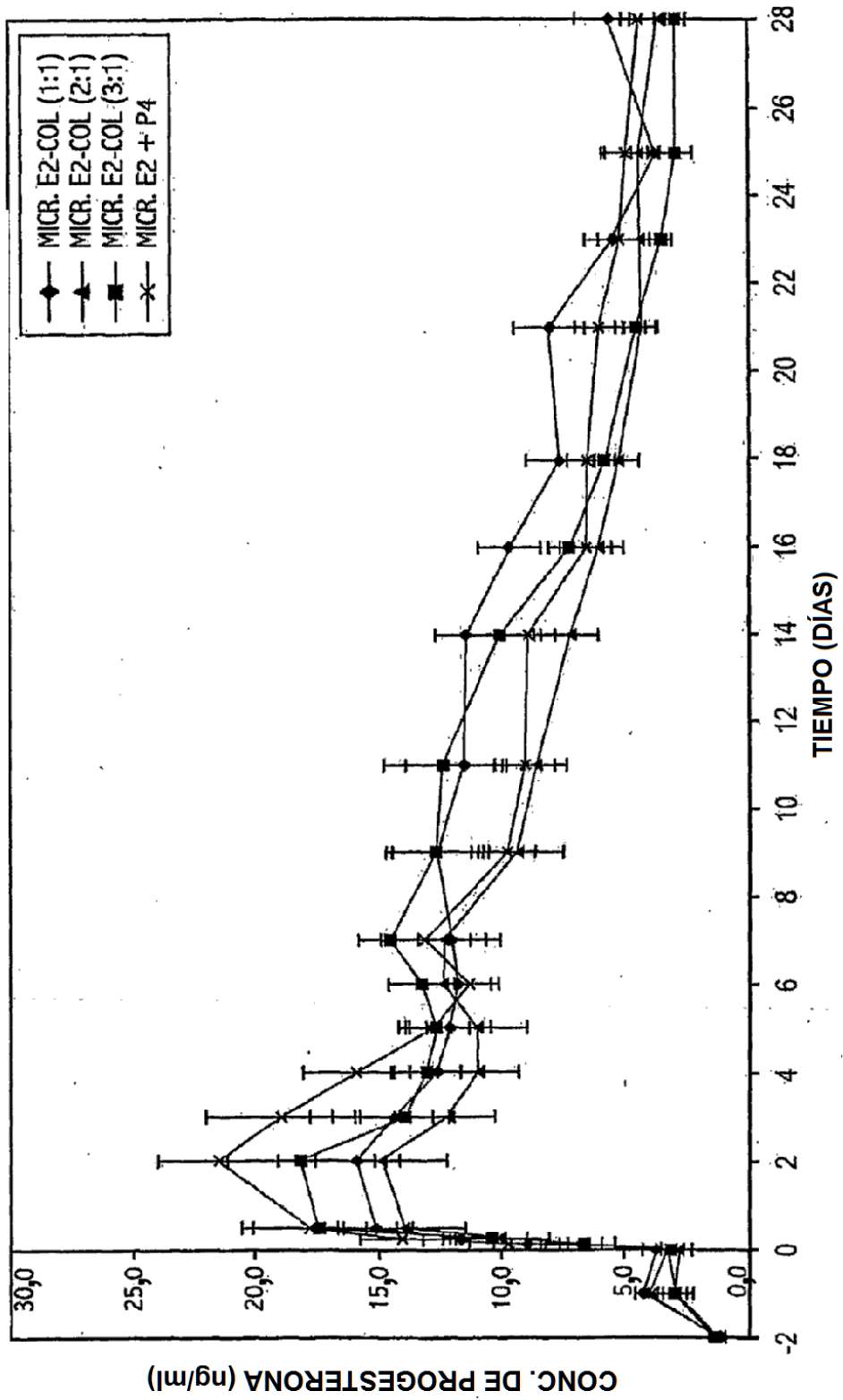
FIG. 9



PERFIL PLASMÁTICO DE PROGESTERONA
ESTUDIO CLÍNICO 0103//APL

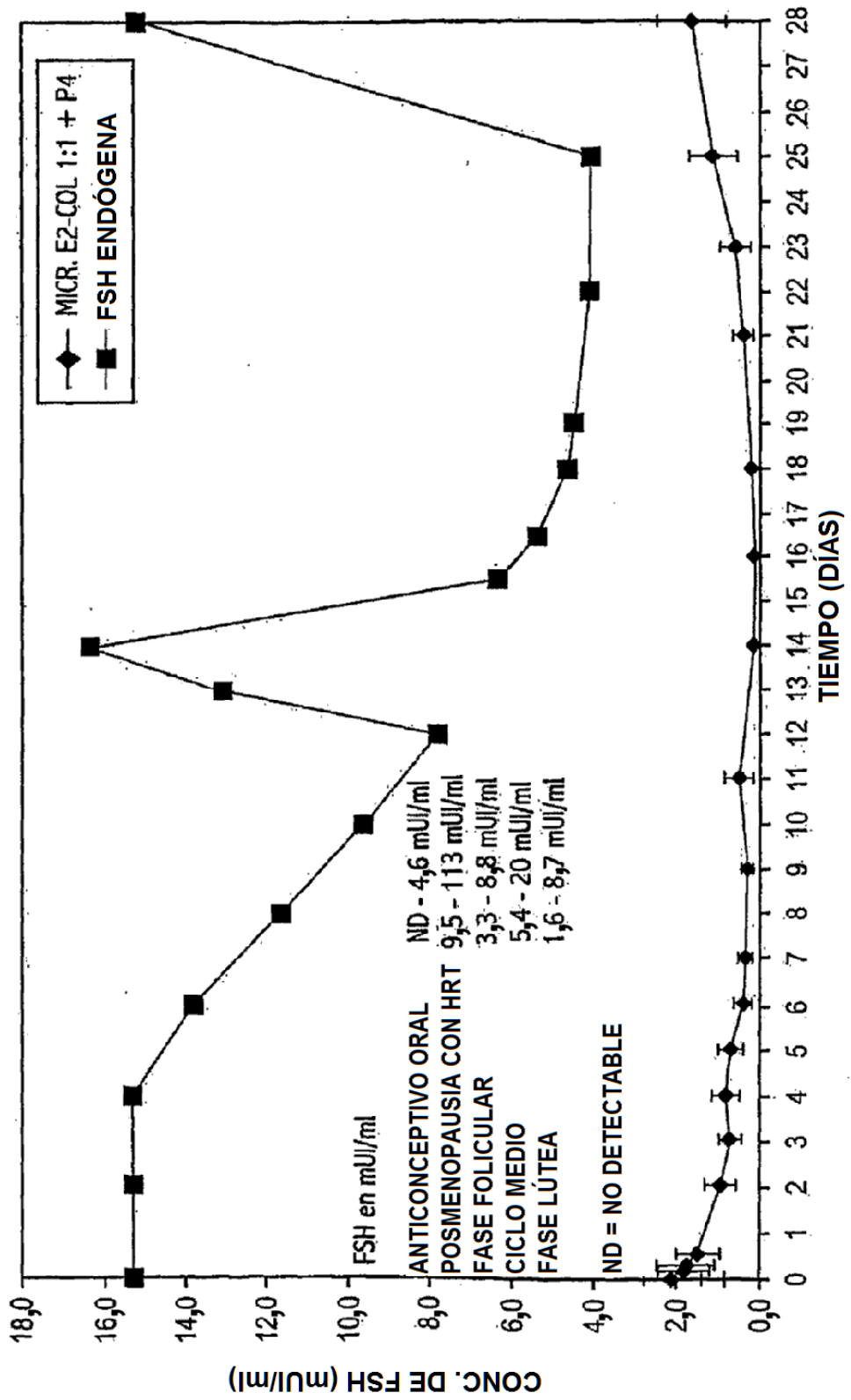
MEDIA \pm E.E. n = 10
DOSIS: E2 9 mg + P4 400 mg

FIG. 10



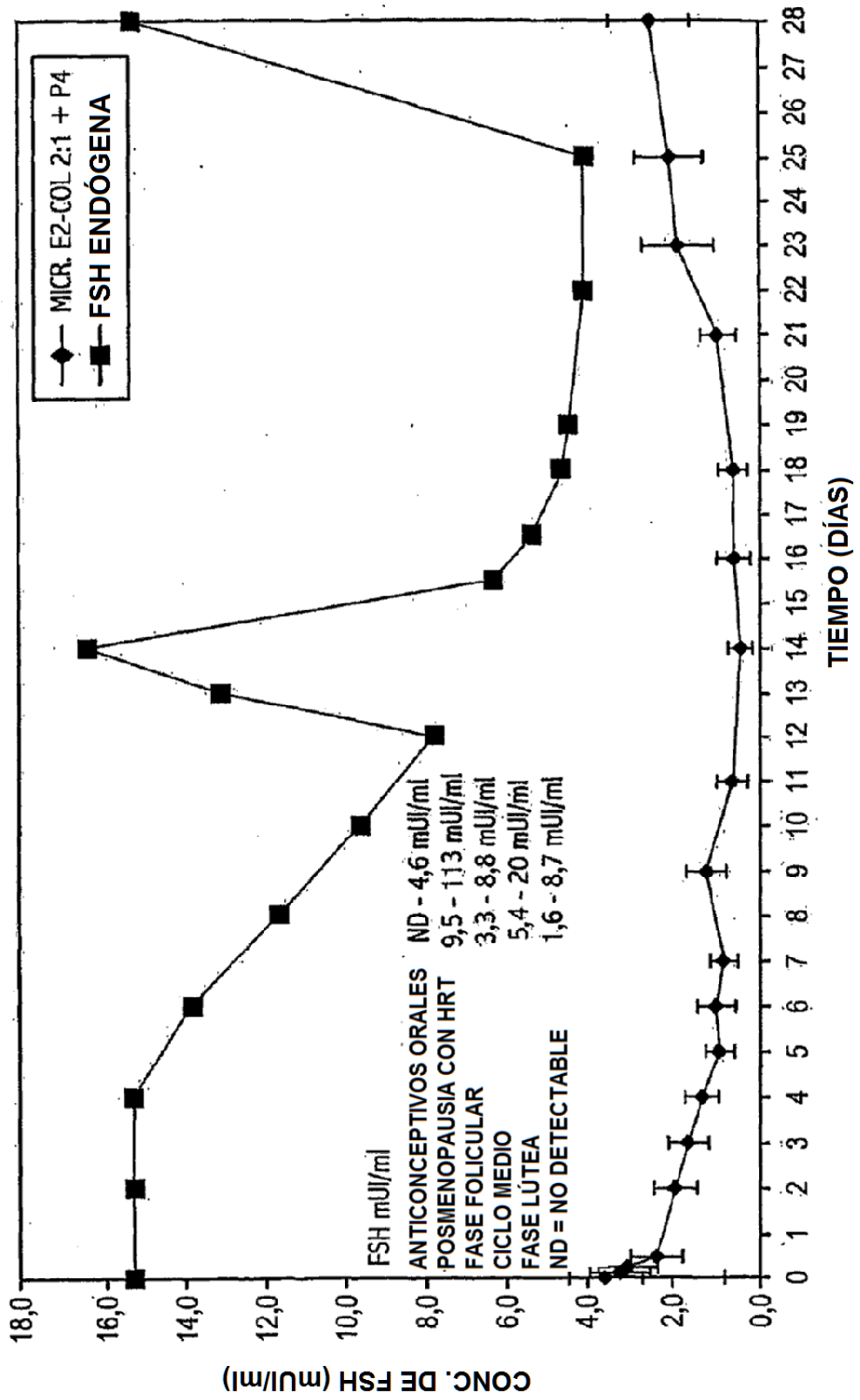
PERFIL PLASMÁTICO DE FSH
 ESTUDIO CLÍNICO 0103//APL
 MEDIA ± E.E. n = 10
 DOSIS: E2 9 mg + P4 400 mg

FIG. 11



PERFIL PLASMÁTICO DE FSH
 ESTUDIO CLÍNICO 0103//APL
 MEDIA ± E.E. n = 10
 DOSIS: E2 9 mg + P4 400 mg

FIG. 12



PERFIL PLASMÁTICO DE LH
 ESTUDIO CLÍNICO 0103//APL
 DOSIS: E2 9 mg + P4 400 mg n = 10

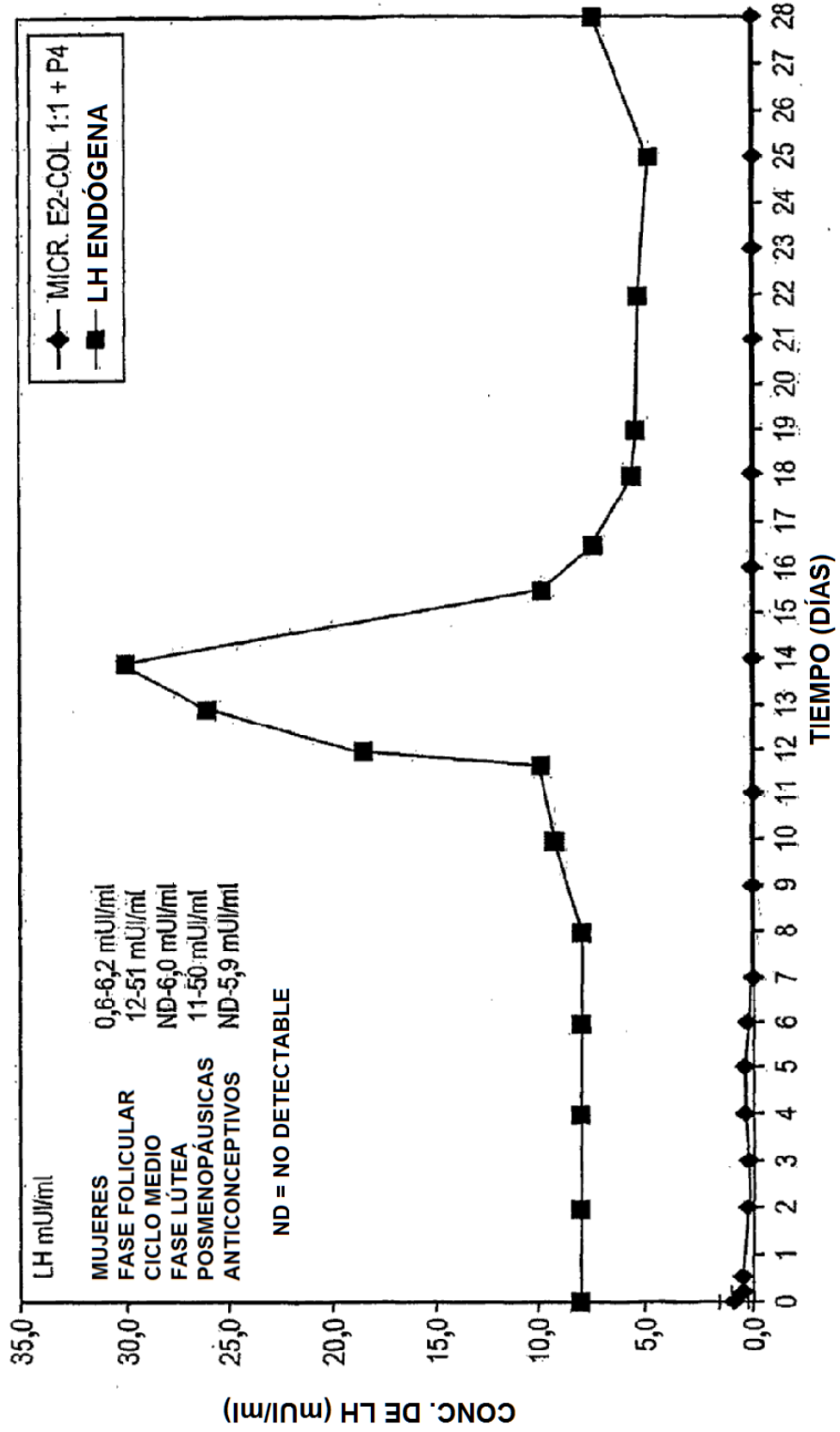


FIG. 13

PERFIL PLASMÁTICO DE LH
 ESTUDIO CLÍNICO 0103//APL
 DOSIS: E2 9 mg + P4 400 mg n = 10

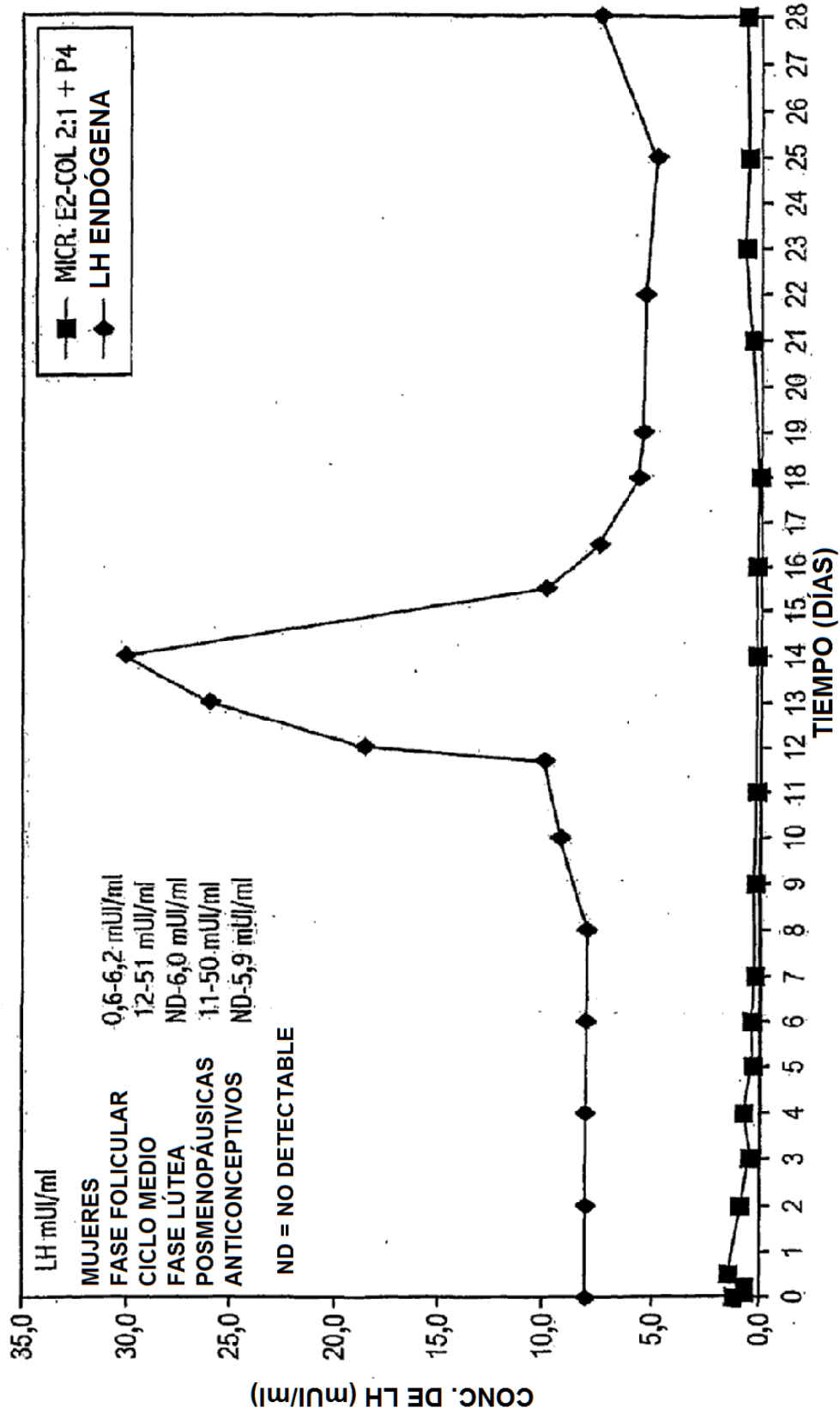
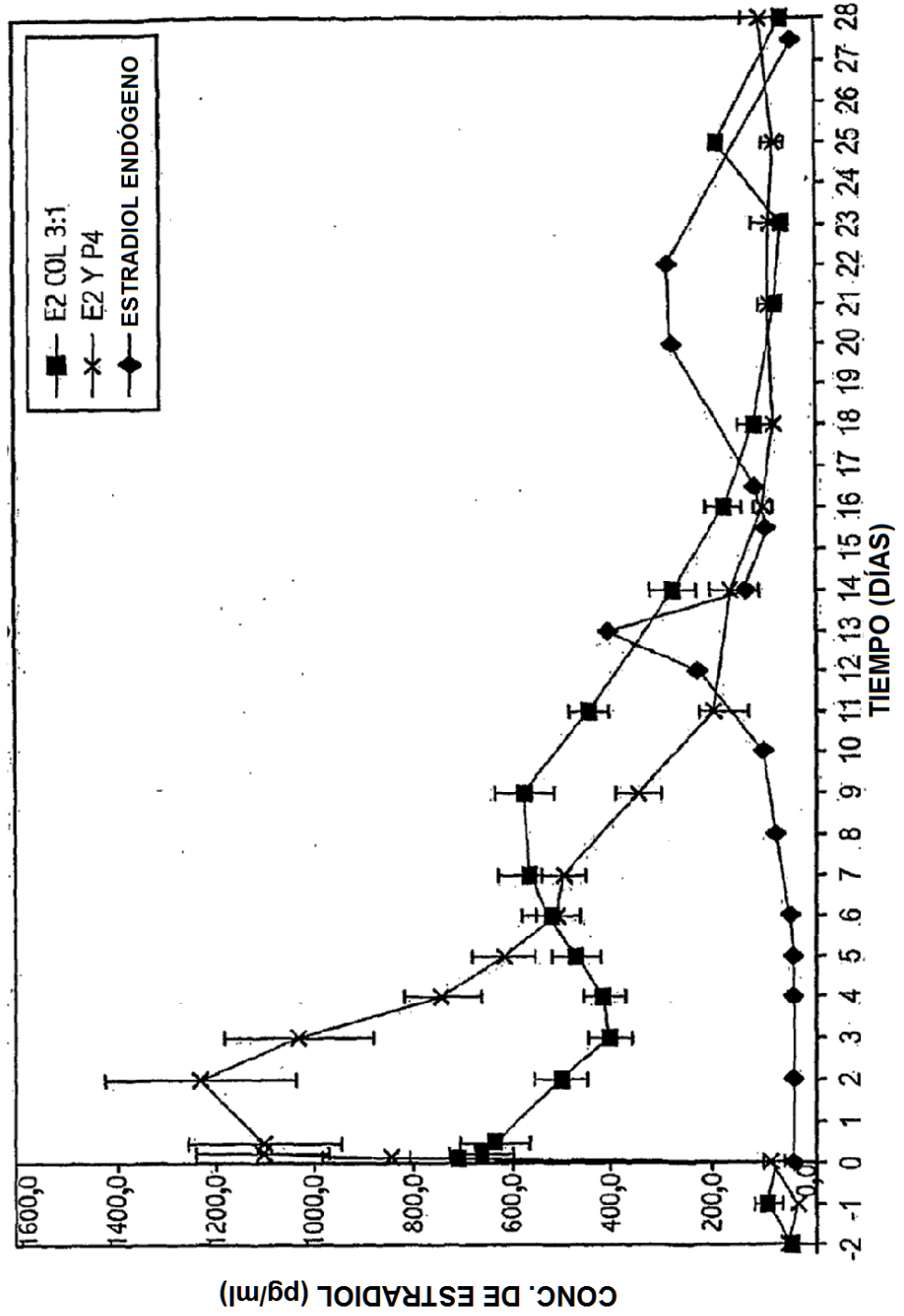


FIG. 14

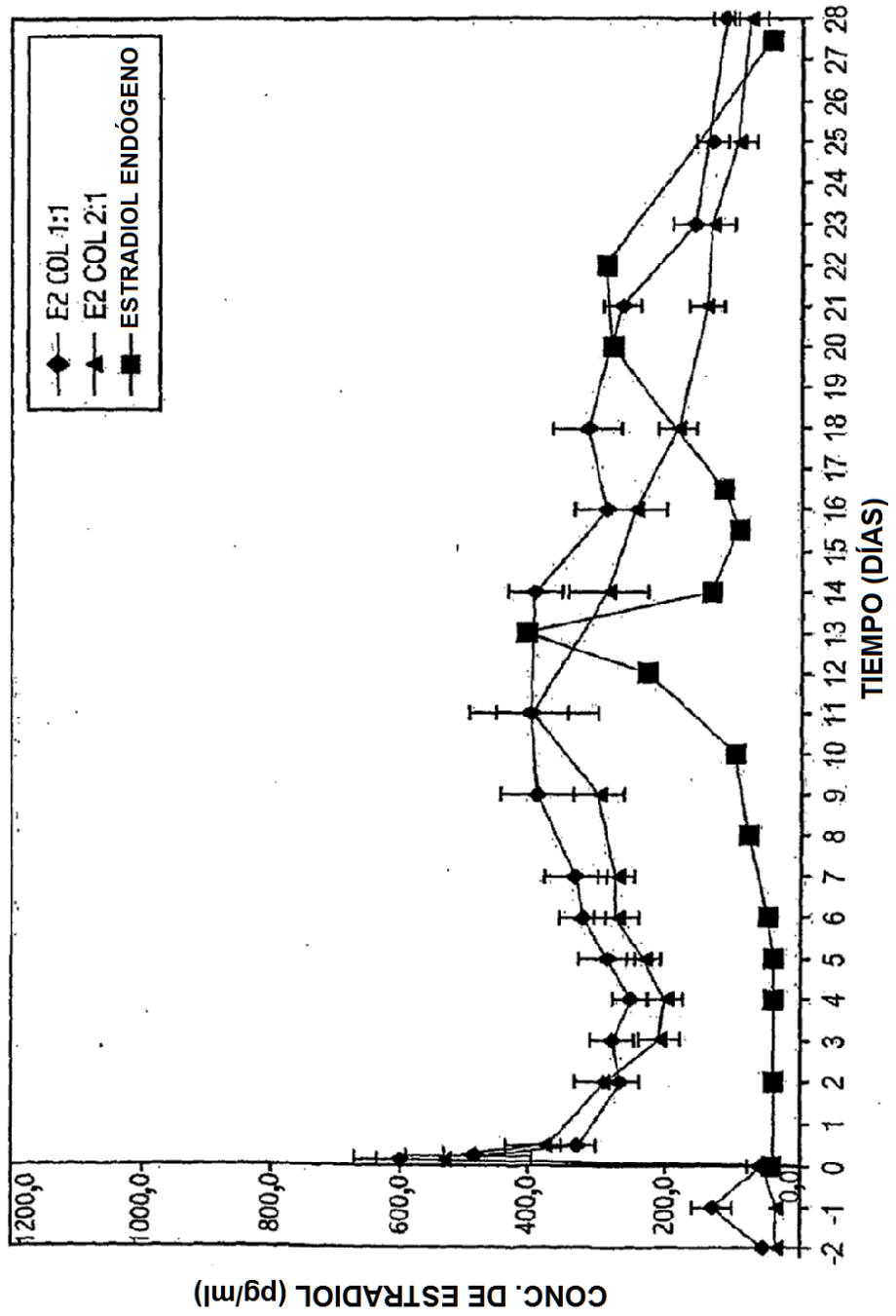
PERFIL PLASMÁTICO DE ESTRADIOL
ESTUDIO CLÍNICO 0103//APL
MEDIA ± E.E. n = 10
DOSIS: E2 9 mg + P4 400 mg

FIG. 15



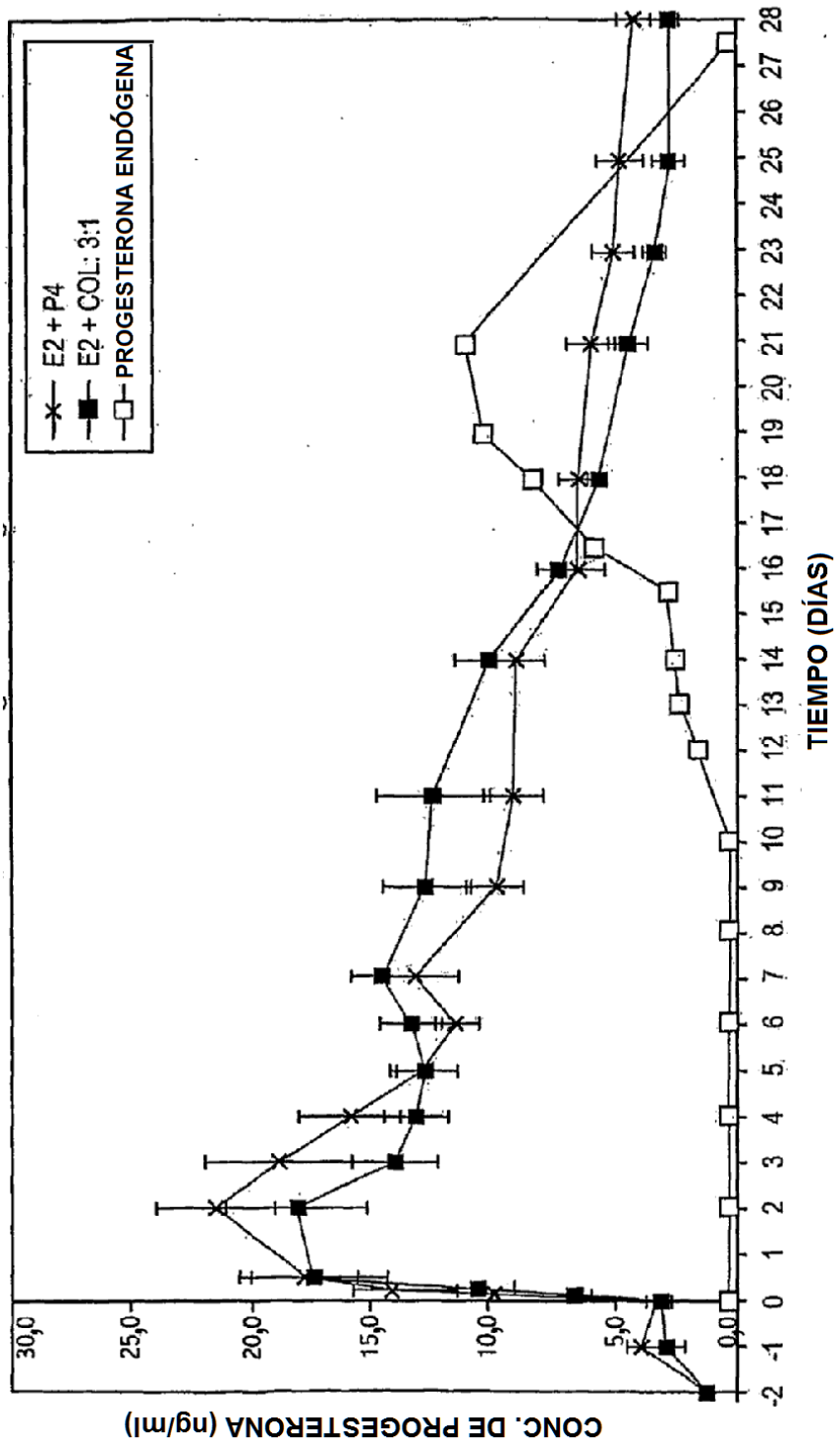
PERFIL PLASMÁTICO DE ESTRADIOL
ESTUDIO CLÍNICO 0103//APL
MEDIA ± E.E. n = 10
DOSIS: E2 9 mg + P4 400 mg

FIG. 16



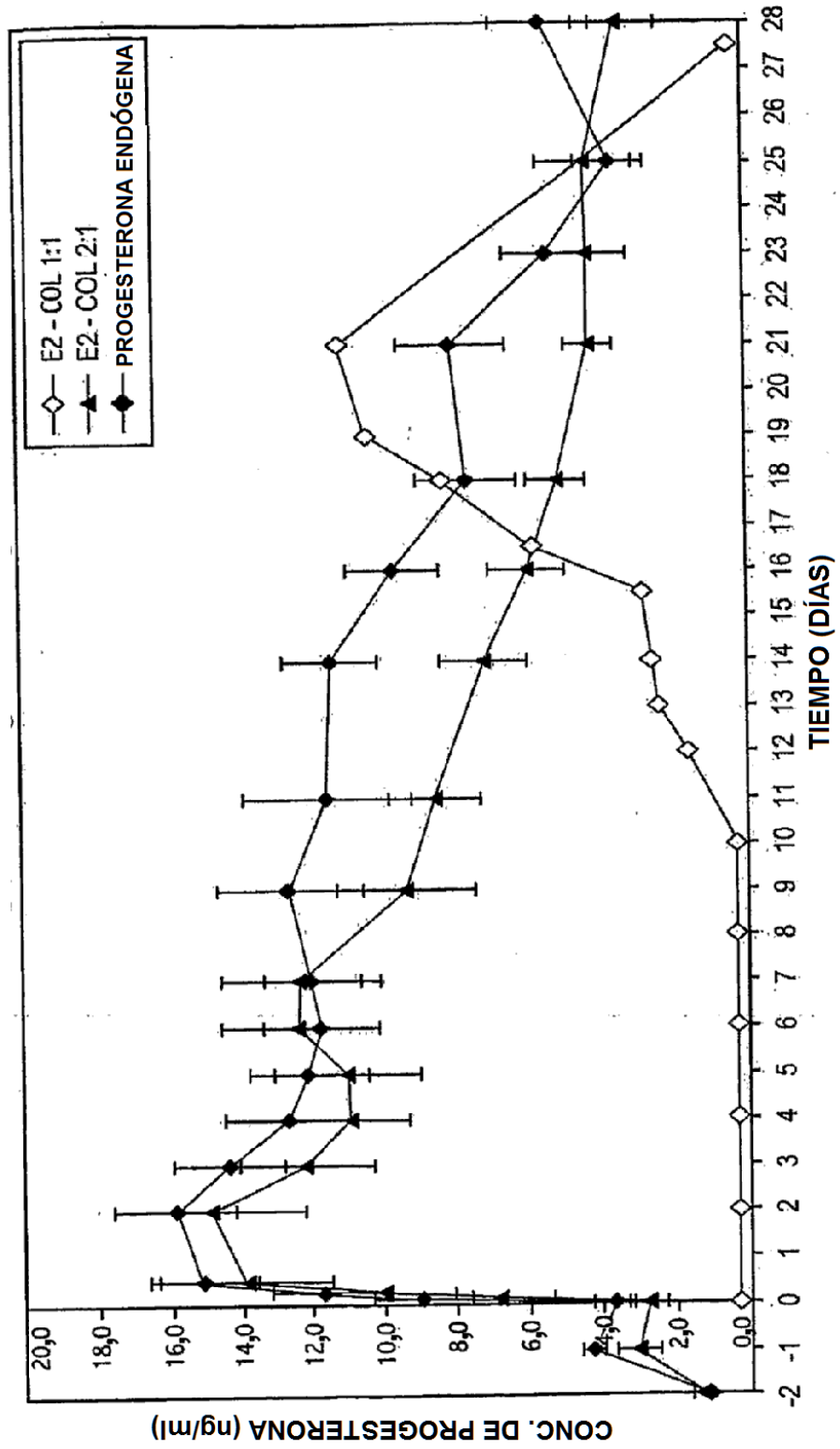
PERFIL PLASMÁTICO DE PROGESTERONA
 ESTUDIO CLÍNICO 0103//APL
 MEDIA ± E.E. n = 10
 DOSIS: E2 9 mg + P4 400 mg

FIG. 17



PERFIL PLASMÁTICO DE PROGESTERONA
ESTUDIO CLÍNICO 0103//APL
MEDIA \pm E.E. n = 10
DOSIS: E2 9 mg + P4 400 mg

FIG. 18



PERFILES DE DISOLUCIÓN COMPARATIVOS DE (1:1) M DE EC PREPARADAS POR EL PROCESO A, B Y C.

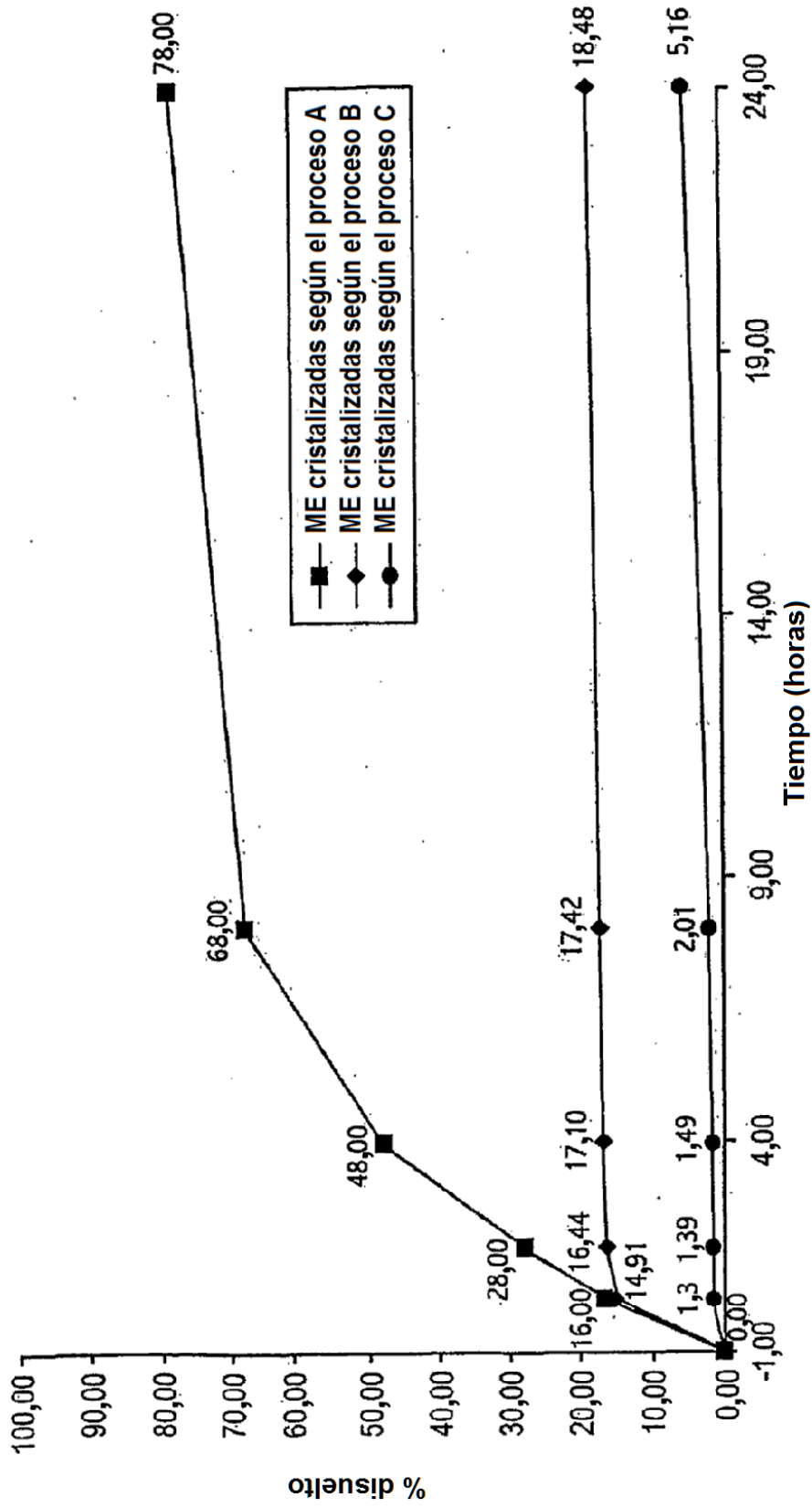


FIG. 19

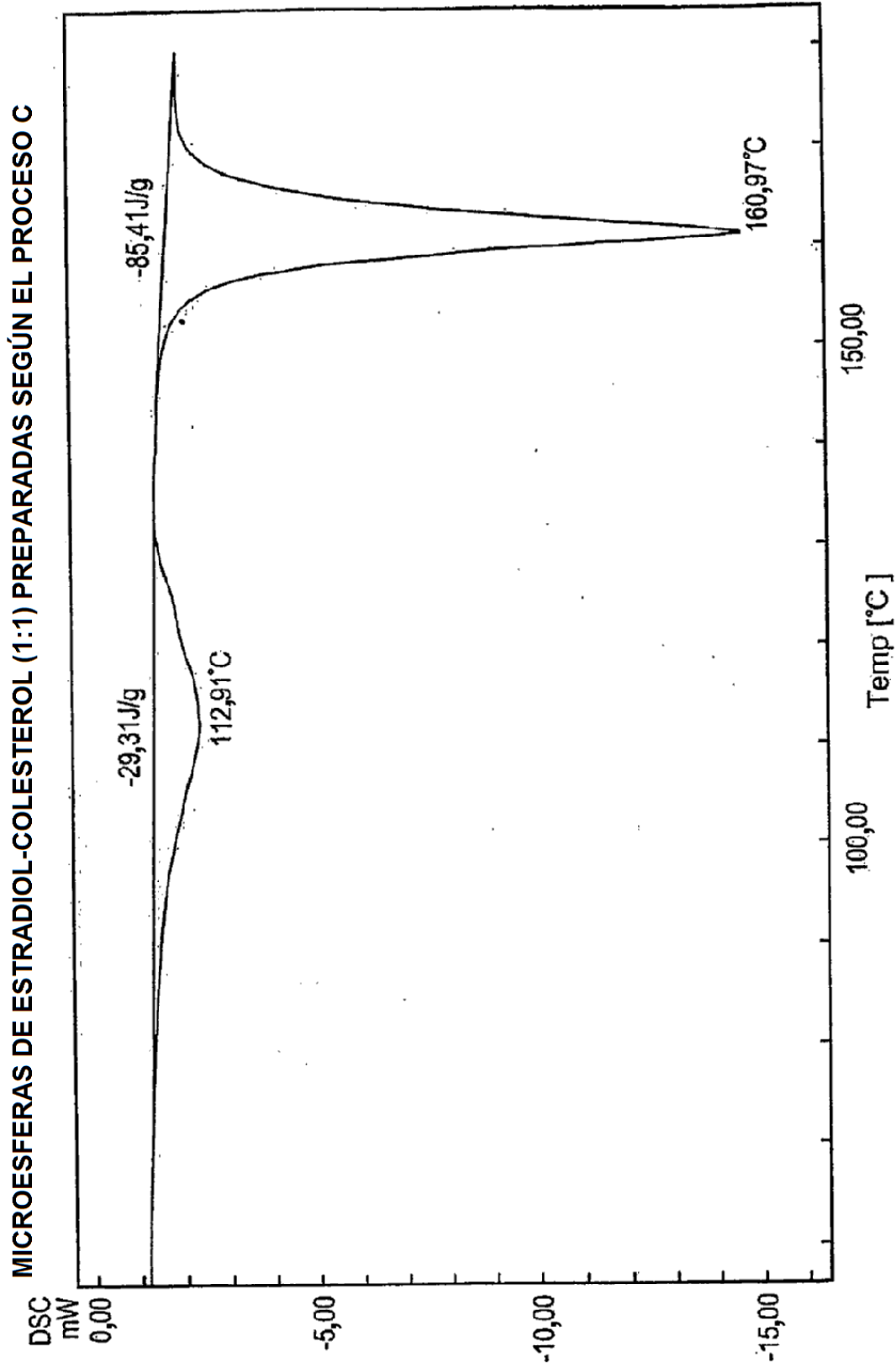


FIG. 20

MICROESFERAS DE ESTRADIOL-COLESTEROL (1:1) PREPARADAS SEGÚN EL PROCESO C

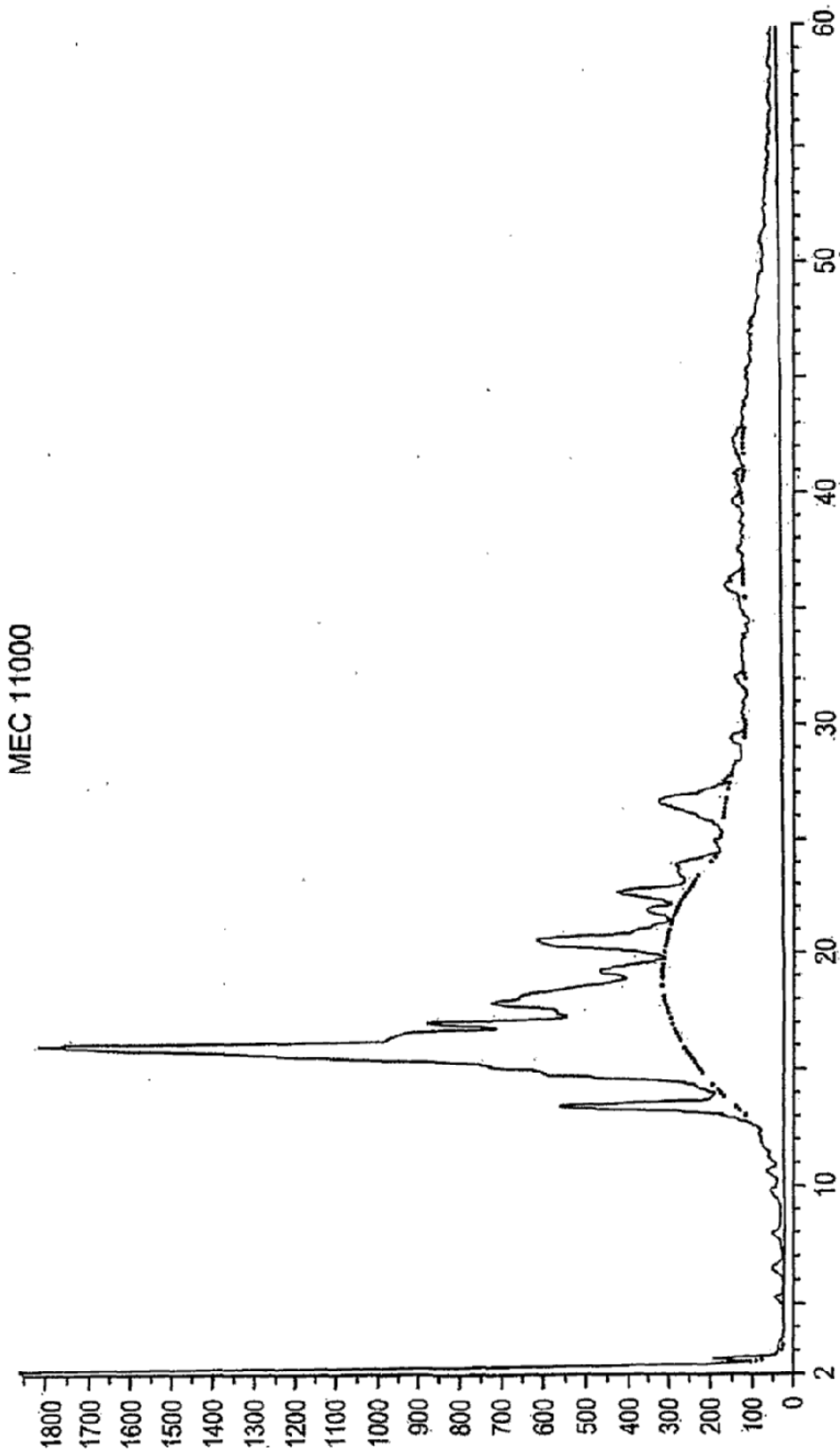


FIG. 21

MICROESFERAS DE ESTRADIOL-COLESTEROL (1:1) PREPARADAS SEGÚN EL PROCESO C

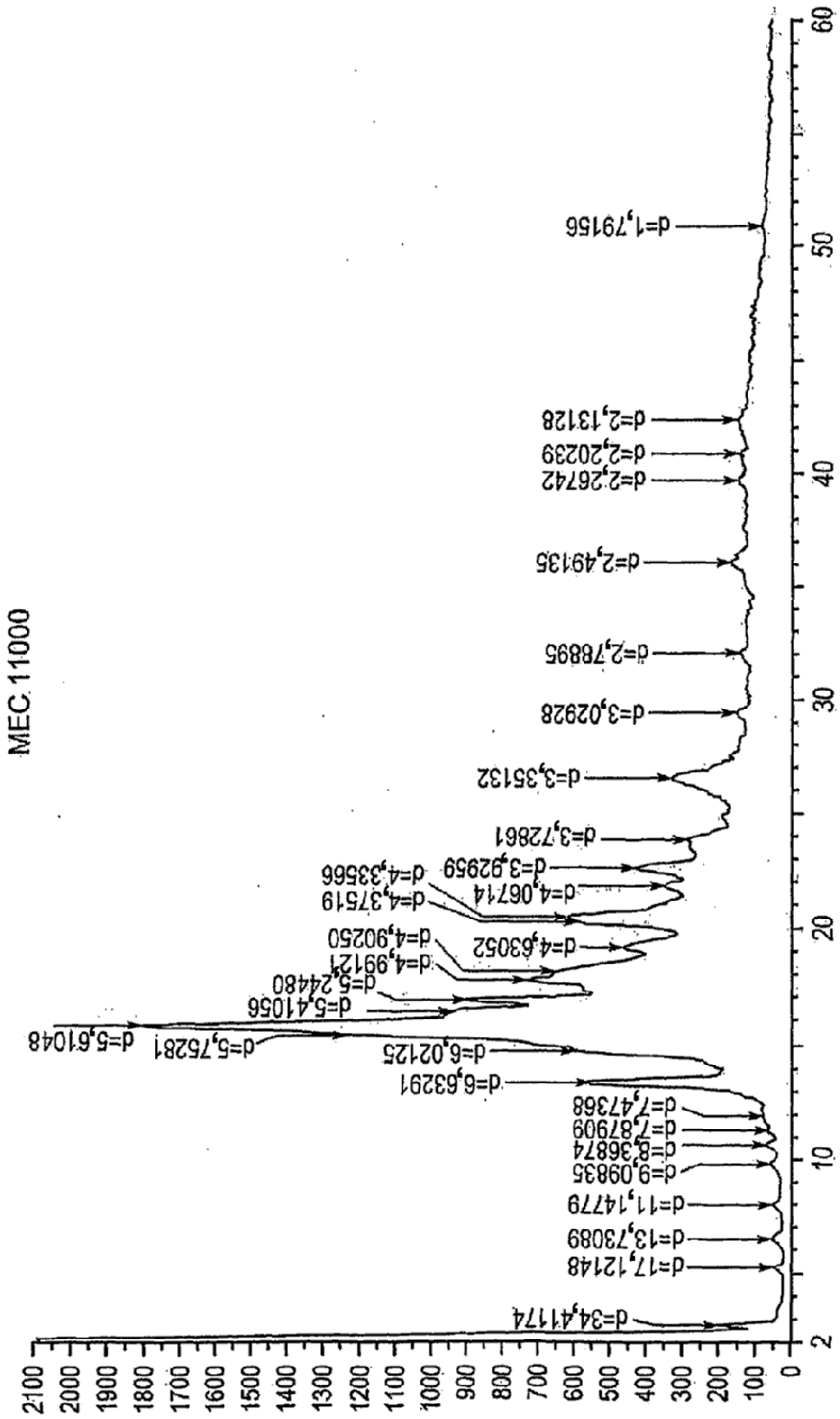


FIG. 22