



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 87627

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 31/568

A61K 47/10

A61P 15/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ У ВИГЛЯДІ ТЕСТОСТЕРОНОВОГО ГЕЛЮ ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ ЛІКУВАННІ ГІПОГОНАДИЗМУ В ЧОЛОВІКІВ**

1

2

(21) а200805981

(22) 12.10.2006

(24) 27.07.2009

(86) PCT/US2006/040481, 12.10.2006

(31) 60/725,276

(32) 12.10.2005

(33) US

(46) 27.07.2009, Бюл.№ 14, 2009 р.

(72) МАЛЛАДІ РАМАНА, US, МІЛЛЕР ДЖОДІ, US

(73) ЮНІМЕД ФАРМАСЬЮТИКЕЛЗ, ЛПС, US, ЛАБОРАТУАР БЕЗЕН ЕНТЕРНАСЬОНАЛЬ, FR

(56) WO 02/17926 A, 07.03.2002

WO 2004/037173 A, 06.05.2004

US 2005/113353 A1, 26.05.2005

US 2005/020552 A1, 27.01.2005

US 2004/072810 A1, 15.04.2004

(57) 1. Фармацевтична композиція водоспиртового гелю, що включає:

i. від 1,15 % до 1,8 % тестостерону;

ii. від 0,6 % до 1,2 % ізопропілміристату;

iii. від 60 % до 80 % спирту, вибраного з групи, що складається з етанолу і ізопропанолу;

iv. кількість загусника, достатню для надання композиції в'язкості понад 9000 сантипуазів; і

v. воду,

в якій процентний вміст ( % ) є відношенням ваги компонентів до ваги водоспиртового гелю.

2. Композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що дана композиція містить від 67,0 % до 74,0 % спирту, вибраного з групи, що складається з етанолу і ізопропанолу.

3. Композиція за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що дана композиція містить від 1,50 % до 1,70 % тестостерону.

4. Композиція за п. 3, яка **відрізняється** тим, що дана композиція містить близько 1,62 % тестостерону.

5. Композиція за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що дана композиція містить від 1,15 % до 1,25 % тестостерону.

6. Композиція за п. 5, яка **відрізняється** тим, що дана композиція містить близько 1,22 % тестостерону.

7. Композиція за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що дана композиція містить від 1,30 % до 1,45 % тестостерону.

8. Композиція за п. 5, яка **відрізняється** тим, що дана композиція містить близько 1,42 % тестостерону.

9. Композиція за будь-яким з пп. 1-8, яка **відрізняється** тим, що дана композиція містить від 0,6 % до 1,4 % загусника.

10. Композиція за будь-яким з пп. 1-9, яка **відрізняється** тим, що загусник формують шляхом з'єднання прекурсора поліакрилової кислоти з нейтралізатором в процесі приготування композиції.

11. Композиція за п. 10, яка **відрізняється** тим, що загусник є нейтралізованим карбомером.

12. Композиція за п. 10 або 11, яка **відрізняється** тим, що нейтралізатор вибраний з групи, що складається з гідроокису натрію, гідроокису амонію, гідроокису калію, аргініну, амінометилпропанолу, тетрагідроксипропілетиленедіаміну, триетаноламіну, трометаміну, PEG-15 кокаміну, діізопропаноламіну, триізопропаноламіну і їх комбінацій.

13. Композиція за п. 10, яка **відрізняється** тим, що нейтралізатор являє собою від 6,5 % до 7,5 % 0,1 N NaOH.

14. Композиція за будь-яким з пп. 1-13, яка **відрізняється** тим, що дана композиція має в'язкість від 13000 сантипуазів до 33000 сантипуазів.

15. Композиція за будь-яким з пп. 1-14, яка **відрізняється** тим, що дана композиція призначена для лікування гіпогонадізму в чоловіків.

16. Композиція за п. 15, яка **відрізняється** тим, що пацієнт має попередню лікуванню концентрацію сироваткового тестостерону менше 300 нг/дл.

17. Спосіб лікування гіпогонадізму в чоловіків, що включає :

a) призначення пацієнту фармацевтичної композиції водоспиртового гелю за будь-яким з пп. 1-14;

b) нанесення терапевтично ефективної дози даної композиції на ділянку шкіри пацієнта, при цьому після нанесення композиції на шкіру пацієнта згадана композиція забезпечує введення в організм пацієнта тестостерону в кількості, достатній для досягнення концентрації тестостерону в сироватці

(13) C2

(11) 87627

(19) UA

крові пацієнта від 298 до 1043 нг тестостерону на 1 дл сироватки.

18. Спосіб за п. 17, який **відрізняється** тим, що лікуванню піддають пацієнта, який перед початком лікування має концентрацію сироваткового тестостерона менше 300 нг/дл.

19. Спосіб за п. 17 або 18, який **відрізняється** тим, що терапевтично ефективну дозу композиції наносять на шкіру пацієнта щодня.

20. Спосіб за п. 19, який **відрізняється** тим, що терапевтично ефективну дозу наносять щодня один раз, двічі або три рази на день протягом принаймні близько 7 днів.

21. Застосування тестостерону для приготування композиції за будь-яким з пп. 1-14 для лікування гіпогонадізму в чоловіків.

22. Застосування за п. 21, яке **відрізняється** тим, що перед початком лікування пацієнт має концентрацію сироваткового тестостерону менше 300 нг/дл.

23. Застосування за п. 21 або 22, яке **відрізняється** тим, що терапевтично ефективна доза композиції наноситься пацієнту щодня.

24. Застосування за п. 23, яке **відрізняється** тим, що терапевтично ефективну дозу наносять щодня один раз, двічі або три рази на день протягом принаймні близько 7 днів.

За даним винаходом вимагається пріоритет, відповідний до пріоритету тимчасової патентної заявки США №60/725,276, поданої 12 жовтня 2005, зміст якої повністю включений до даної заявки методом посилання.

Тестостерон, основний циркулюючий андроген в чоловіків, синтезований з холестеролу. Більш ніж 95% з 6-7мг тестостерону, що виробляється щодня, виділяється, приблизно, 500 мільйонами клітин Лейдіга в яєчках. Для розвитку і підтримки тестікулярної функції і негативного регулювання створення тестостерону необхідна наявність двох гормонів, що виробляються гіпофізом, а саме, лютеїнізуючого гормону ("LH") і фолікулостимулюючого гормону ("FSH"). У тілі людини циркулюючий тестостерон перетворюється у всілякі 17-кетостероїди двома різними метаболічними шляхами. Тестостерон може перетворюватися в дигідротестостерон ("DHT") під дією ферменту 5 $\alpha$ -редуктази або в естрадіол ("E2") під впливом ферментного комплексу ароматази.

В крові циркулює тестостерон, що на 98% зв'язаний з протеїном. В чоловіків майже 40% зв'язків складають зв'язки з високоафінним гормонозв'язувальним статевим глобуліном ("SHBG"). Інші 60% слабо зв'язані з альбуміном. При цьому ряд вимірювань тестостерону отримано з клінічних лабораторій. Термін "вільний" тестостерон в контексті даного опису означає фракцію тестостерону в крові, яка не зв'язана з протеїном. Термін "загальний тестостерон" або "тестостерон" в даному контексті означає кількість, складену з вільного тестостерону і тестостерону, зв'язаного з протеїном. Термін "біодоступний тестостерон" в контексті даного опису означає не-SHBG-зв'язаний тестостерон і включає тестостерон, слабо зв'язаний з альбуміном.

Наведена нижче таблиця, що підготовлена UCLA-Harbor Medical Center, підводить підсумок дослідження концентрації гормонів в організмі нормального дорослого чоловіка:

Таблиця 1

Рівні гормонів в організмі нормального чоловіка

Гормон	Нормальний діапазон
Тестостерон	від 298 до 1043нг/дл (ng/dL)

Вільний тестостерон	від 3,5 до 17,9нг/дл (ng/dL)
DHT	від 31 до 193нг/дл (ng/dL)
Відношення DHT/T	від 0,052 до 0,33
DHT+T	від 372 до 1349нг/дл (ng/dL)
SHBG	від 10,8 до 46,6нмоль/л (nmol/L)
FSH	від 1,0 до 6,9мл а.е.м./мл (mIU/mL)
LH	від 1,0 до 8,1мл а.е.м./мл (mIU/mL)
E <sub>2</sub>	від 17,1 до 46,1пг/мл (pg/mL)

Виходячи з публікацій, спостерігаються значні розбіжності в тривалості часу на півжиття тестостерону, діапазон якого знаходиться в межах від 10 до 100 хвилин. Проте, дослідники, дійсно, згодні з тим, що в нормального молодого чоловіка спостерігаються добові коливання тестостерону. Максимальні рівні досягаються, приблизно, з 6.00 до 8.00 ранку, при цьому показники рівнів відхиляються від максимальних значень протягом дня. Максимальний рівень тестостерону для характеристичних профілів складає 720нг/дл, а мінімальний - 430нг/дл. Проте фізіологічне значення даного добового циклу, якщо він існує, на даному етапі досліджень не з'ясоване.

Чоловічий гіпогонадізм є результатом різних патофізіологічних станів, при яких концентрація тестостерону опускається нижче за нормальний рівень. Гіпогонадальний стан іноді пов'язаний з цілою низкою фізіологічних змін, наприклад, із зниженням інтересу до сексу, імпотенцією, зниженням м'язової маси тіла (виснаженням), зниженням густини кісток, депресією і занепадом сил.

Дослідники, в основному, підрозділяють гіпогонадізм на три типи. Перший тип гіпогонадізму включає тестикулярні порушення через природжену або придбану анорхію, синдром ХҮҮ, характерні особливості осіб чоловічої статі ХХ, синдром Нунан, гонадальний дисгенезис, пухлини клітин Лейдіга, порушення процесу опускання яєчок, варикозного розширення вен сім'яного канатика, синдром Sertoli-Cell-Only, крипторхидизм, білатеральний перекурт, синдром блукаючих яєчок (втрачають здатність функціонувати), орхіектомію, синдром Клайнфельтера-Рейнфенштейна-Олбрайта, хіміотерапію, токсичне пошкодження

алкоголем або важкими металами, загальні захворювання (ниркову недостатність, цироз печінки, діабет, міотонічну дистрофію). Пацієнти з першим типом гіпогонадізму проявляють інтактний механізм зворотного зв'язку, при якому низькі концентрації сироваткового тестостерону асоціюються з високими концентраціями FSH і LH. Проте через тестикулярну або іншу недостатність, високі концентрації LH виявляються нездібними ефективно стимулювати відтворення тестостерону.

Другий тип гіпогонадізму припускає дефіцит ідіопатичного гонадотропіну або LH-виділяючого (секретуючого) гормону. Даний тип гіпогонадізму включає синдром Колмана, синдром Прадера-Лабхарта-Віллі, синдром Лоренса-Муна-Бідля, недостатність гіпофізу/аденоми, синдром Паску-аліні, гемохроматоз, гіперпролактинемію або гіпофіз-гіпоталамічне ослаблення унаслідок пухлини, травми, радіації або ожиріння. Оскільки пацієнти з другим типом гіпогонадізму не проявляють інтактного метаболічного шляху зворотного зв'язку, знижені концентрації тестостерону не асоціюються з підвищеними рівнями LH або FSH. Таким чином, хоча дані чоловіки і мають низькі рівні сироваткового тестостерону, але їх гонадотропіни знаходяться в нормі, наближаючись до нижньої межі.

Гіпогонадізм, ймовірно, залежить від віку. Чоловік зазнає повільного, але неухильного зниження вмісту середньої кількості тестостерону у віці, приблизно від 20 до 30 років. За підрахунками дослідників, дане зниження складає 1-2% в рік. Дослідження, що стосуються різних вікових груп чоловіків, показали, що середнє значення кількості тестостерону у віці 80 років складає приблизно 75% від тієї кількості, яка спостерігалася в 30 років. Оскільки в чоловіків сироваткова концентрація SHBG з віком збільшується, зниження біологічно активного і вільного тестостерону відбувається навіть інтенсивніше, ніж зниження загального тестостерону. Дослідники підраховували, що, приблизно, 50% здорових чоловіків у віці від 50 до 70 років мають рівні біологічно активного тестостерону нижчі за нормальну нижню межу. Більш того, циркадний ритм концентрації тестостерону з віком у чоловіків знижується, затухає або повністю зникає. Проблема старіння, головним чином, пов'язана з функціонуванням гіпоталамічно-гіпофізного апарату. Так, наприклад, дослідники встановили, що з віком рівні LH не підвищуються, не дивлячись на низькі рівні тестостерону. Незалежно від причини, такий непіддатний лікуванню дефіцит тестостерону в чоловіків більш старшого віку може привести до різних фізіологічних змін, включаючи порушення статевої функції, зниження лібідо, втрату м'язової маси, зниження густини кісток, депресію, зниження розумових здібностей. Неминучим результатом всього цього є виникнення геріатричного гіпогонадізму або, іншими словами, "чоловічої менопаузи".

В даний час гіпогонадізм є найбільш поширеною гормональною недостатністю в чоловіків, що вражає 5 чоловік на кожну тисячу. Підраховано, що тільки п'ять відсотків з обстежених від чотирьох до п'яти мільйонів американських чоловіків всіх віків, уражених гіпогонадізмом, одержують тера-

пію, що забезпечує адекватну заміну тестостерону, якого бракує.

Винахід відноситься до поліпшеної трансдермальної композиції водоспиртового тестостеронного гелю, який, крім всього іншого, забезпечує заданий фармакокінетичний гормонний профіль, і до способів її використання.

На Фіг.1 показана стандартизована схема Pareto, що демонструє дію тестових показників тестостерону, ізопропілміристату і етилового спирту на співвідношення "зміна реакції-в'язкість".

На Фіг.2 показана стандартизована схема Pareto, що демонструє дію тестових показників тестостерону, ізопропілміристату і етилового спирту на відсоток просочування наклепки.

На Фіг.3 показана стандартизована схема Pareto, що демонструє дію тестових показників тестостерону, ізопропілміристату і етилового спирту на коефіцієнт CAR (Ratio CAR).

На Фіг.4 дана схема дослідженої поверхні реакції, яка ілюструє досліджене співвідношення (коефіцієнт CAR) для даної комбінації тестостерон і ізопропілміристату для вмісту спирту (95% v/v (об'єм/об'єм)), що становить 74,3 вагових відсотків (wt%).

На Фіг.5 показана контурна схема, що представляє контури схеми дослідженої поверхні реакції на Фіг.4.

На Фіг.6 показаний графік, що представляє накопичену кількість тестостерону, виділеного протягом заданого проміжку часу, відносно різних тестостеронових композицій (від F57 до F59), порівняно з еталонною композицією (F56).

На Фіг.7 показаний графік, який представляє кумулятивну (сукупну) кількість тестостерону, що просочився протягом заданого проміжку часу, відносно композиції F57.

На Фіг.8 показаний графік, який представляє сукупну кількість тестостерону, що просочився протягом заданого проміжку часу, відносно композиції F58.

На Фіг.9 показаний графік, який представляє сукупну кількість тестостерону, що просочився протягом заданого проміжку часу, відносно композиції F59.

На Фіг.10 показаний графік, який представляє профілі співвідношення "середня концентрація - час" для досліджуваного тестостерону в день 1.

На Фіг.11 показаний графік, що представляє профілі співвідношення "середня концентрація - час" для досліджуваного тестостерону в день 14.

Не дивлячись на те, що даний винахід може бути представлений цілим рядом різних прикладів здійснення, в даному описі наведені тільки деякі з них, при цьому слід мати на увазі, що опис цих прикладів є тільки ілюстрацією основних істотних ознак, а об'єм захисту винаходу не обмежується наведеними прикладами. Не дивлячись на те, що в даному документі винахід ілюструється, посилячись на тестостерон, слід розуміти, що будь-який інший стероїд в синтетичному шляху тестостерону, при необхідності, може повністю або частково використовуватися замість тестостерону в розкритих способах, медичних наборах, комбінаціях і композиціях.

Даний винахід відноситься до вдосконаленої композиції тестостеронового гелю і способів його використання.

В одному з прикладів здійснення даний винахід направлений на створення способу введення через шкіру тестостерону у складі водоспиртного гелю. Гель включає тестостерон (або похідне тестостерону); один або декілька нижчих спиртів, наприклад етанол або ізопропанол; речовину, що підсилює проникаючу здатність, наприклад, ізопропілміристант; загусник і воду. Крім того, композиція за даним винаходом, як альтернатива, може включати солі, емульгатори, стабілізатори, протимікробні засоби, ароматизатори і смакові добавки, а також пропеланти.

Даний винахід включає також медичні набори, способи, комбінації і фармацевтичні композиції для лікування, запобігання (профілактики) виникнення захворювання або хворобливого стану, повернення до первинного здорового стану, припинення або уповільнення розвитку гіпогонадизму або інших хворобливих станів, асоційованих з низьким вмістом тестостерону в особі, у якій симптоми хвороби клінічно виражені, або лікування симптомів, пов'язаних або таких, що відносяться до гіпогонадизму або хворобливого стану, асоційованого з низьким вмістом тестостерону. Пацієнт може вже мати діагноз гіпогонадизму та/або стану, визначуваного низьким вмістом тестостерону у момент прийому, відноситися до групи ризику розвитку гіпогонадизму та/або стану, визначуваного низьким вмістом тестостерону. Даний винахід, переважно, використовується при лікуванні дорослих пацієнтів старших за 18 років. Більш переважно, даний винахід використовується при лікуванні дорослих пацієнтів старших за 21 рік.

Термін "похідне" відноситься до сполуки, яку одержують з іншої сполуки подібної структури шляхом заміни або заміщення одного атома, молекули або групи іншим атомом, молекулою або групою. Наприклад, атом водню будь-якої сполуки може замінитися алкілом, ацилом, аміно і іншими елементами для отримання похідного початкової сполуки.

В контексті даного винаходу термін «нижчий спирт», окремо або в комбінації, означає спиртову частку з прямим або розгалуженим ланцюгом, що містить від одного, приблизно, до шести атомів вуглецю. В одному з прикладів здійснення нижчий спирт містить від одного до, приблизно, 4 атомів вуглецю і ще в одному прикладі здійснення нижчий спирт містить від одного до, приблизно, 3 атомів вуглецю. Прикладами таких спиртових часток є метанол, етанол, етанол USP (тобто, 95% v/v (об'єм/об'єм)), n-пропанол, ізопропанол, n-бутанол, ізобутанол, сек-бутанол і терт-бутанол.

В контексті даного винаходу термін "етанол" відноситься до сполуки за формулою  $C_2H_5OH$ . Він може бути використаний у вигляді зневодненого спирту USP (фармакопей США), спирту USP або у вигляді будь-якої іншої звичайної форми, включаючи комбінацію з різними кількостями води.

Композиція використовується у "фармакологічно ефективній кількості". Це означає, що концентрація введеного лікарського засобу повинна бути

такою, який забезпечує в композиції належний терапевтичний рівень ліків, що доставляються в тканини протягом всього періоду часу, коли дані ліки повинні бути використані. Специфіка такої доставки залежить від ряду змінних величин, включаючи період часу, протягом якого окрема дозована одиниця повинна бути використана, швидкості витрати ліків з композиції, наприклад, тестостерону з гелю, площі поверхні нанесення гелю і т.п. Наприклад, відносно тестостерону, необхідна кількість тестостерону може бути експериментально визначена, ґрунтуючись на швидкості витрати тестостерону через гель і через шкіру з використанням підсилювачів процесу і без них.

В одному з прикладів здійснення даний винахід направлений на створення способу черезшкірного введення тестостерону у водоспиртовому гелі. Гель включає один або декілька нижчих спиртів, наприклад етанол або ізопропанол; речовину, що підсилює проникаючу здатність, загусник і воду. В одному з прикладів здійснення гель містить попередник аніонного полімерного загусника, нейтралізований речовиною, що виділяє гідроксид, наприклад гідроксид натрію. Крім того, композиція за даним винаходом, як альтернатива, може включати солі, емульгатори, стабілізатори, протимікробні засоби, ароматизатори і смакові добавки, а також пропеланти.

Способи і фармацевтичні композиції за даним винаходом включають ізомеричні форми і таутомери описаних сполук і їх фармацевтично прийнятних солей. Наведені приклади фармацевтично прийнятних солей готують з мурашиної, оцтової, пропіонової, янтарної, гліколевої, глюконової, молочної, яблучної, винної, лимонної, аскорбінової, глюкуронової, малеїнової, фумарової, піровиноградної, аспаргінової, глютамінової, бензойної, антраїлової, мезилової, стеаринової, саліцилової, r-гідроксибензойної, фенілоцтової, мигдалевої, ембонової (памової), метансульфонової, етансульфонової, бензолсульфонової, пантотенової, толуолсульфонової, 2-гідроксиетансульфонової, сульфанілової, циклогексиламіносульфонової, альгінової, b-гідроксимасляної, галактарової і галактуренової кислоти.

Перелік загусників, придатних для використання даного винаходу, можуть включати нейтралізовані аніонні полімери, наприклад, поліакрилову кислоту. Переважними є карбомерні поліакрилові кислоти, зокрема, такі, що виробляються і продаються на ринку товарів фірмою Noveon Inc. Cleveland, Ohio з торговою маркою Carbopol® (див. інформацію на сайті <http://www.noveon.com>, включену в даний документ методом посилання). Особливо переважними є Carbopols® Ultrez 10, 940, 941, 954, 980, 981, ETD 2001, EZ-2 і EZ-3. Найбільш переважним є Carbopol® 940 і Carbopol® 980. Перелік інших придатних до використання аніонних полімерів включає карбоксиполіметилен і карбоксиметилцелюлоза. Придатними до використання є також інші відомі з рівня техніки полімерні загусники, наприклад, полімерні емульгатори під торговою маркою Pemulen® і полікарбофіли під торговою маркою Noveon®. Додаткові загусники, підсилюва-

чі і ад'юванти можуть бути знайдені в довіднику США по фармакопеї (Remington's Science and Practice Pharmacy, Meade Publishing Co., United States Pharmacopeia/National Formulary), все перераховане включене в цей документ методом посилання.

В одному з прикладів здійснення даного винаходу композиція є гелем, маззю, кремом або шіастиром і складається з тестостерону, підсилювача проникаючої здатності, наприклад, ізопропілміристату; загусника, наприклад, нейтралізованого карбомера, нижчого спирту, наприклад, етанолу або ізопропанолу, і води.

В іншому прикладі здійснення винаходу композиція містить попередник аніонного полімерного загусника, наприклад, карбомер, який заздалегідь сполучений з нейтралізатором, в кількості, достатній для формування гелю в процесі формування композиції.

Ще в одному прикладі здійснення винаходу композиція містить попередник аніонного полімерного загусника, наприклад, карбомер, заздалегідь сполучений з нейтралізатором, в кількості, достатній для формування гелю з в'язкістю вище за 9000 cps (сантипуазів), виміряній за допомогою віскозиметра Brookfield RV D VII+ зі шпінделем (крутильним пристроєм) рівним RV6, при швидкості обертання, рівній 10об/мин, і підтримуваній температурі 20°C.

Ще в одному прикладі здійснення винаходу композиція містить попередник аніонного полімерного загусника, наприклад, карбомер, заздалегідь сполучений з нейтралізатором, вибраним з групи, що включає гідроокис натрію (ідкий натр), гідроокис амонію, гідроокис калію (ідкий калій), аргінін, амінометилпропанол, тетрагідроксипропіл етилендіамін, тітаноламін ("TEA"), трометамін, PEG-15

кокамін, діізопропаноламін і триізопропаноламін або їх комбінації в кількості, достатній для нейтралізації попередника аніонного полімерного загусника, з метою формування гелю в процесі приготування композиції. Придатні для використання нейтралізуючі речовини і їх застосування з вибраними попередниками аніонних полімерних загусників розкриті компанією Noveon Inc. Cleveland, Ohio, в роботі "Neutralizing Carbopol® and Pemulen® Polymers in Aqueous and Hydroalcoholic Systems ("Нейтралізуючі полімери Carbopol® і Pemulen® у водних і водоспиртних системах"), Commercial Brochure TDS-237 (October 1998), що включена в даний документ методом посилання.

Ще в одному прикладі здійснення винаходу композиція містить попередник аніонного полімерного загусника, наприклад, карбомер, заздалегідь сполучений з нейтралізатором, яким є водний розчин гідроокису натрію, наприклад, 0,1N гідроокис натрію, або 1,5N гідроокис натрію, або 2,0N гідроокис натрію, або будь-який інший відповідний сильний водний розчин в кількості, достатній для формування гелю. В одному з прикладів здійснення винаходу композиція була приготована з використанням, приблизно, від 1,0% до 10,0% 0,1N гідроокису натрію. Відповідно, можуть бути використані приклади здійснення, в яких застосовується будь-який процентний вміст від 1,0% до 10,0% 0,1N NaOH, наприклад, 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0%, 5,0%, 6,0%, 7,0%, 8,0%, 9,0% або 10,0% 0,1N NaOH.

В одному з прикладів здійснення композиція представлена у вигляді гелю і приготована шляхом з'єднання наступних речовин з наступним зразковим процентним вмістом.

Таблиця 2

Інгредієнти, сполучені для отримання тестостеронової композиції (% w/w (вага/вага))

Т (Тестостерон)	Спирт (95% об'єм/об'єм)	Ізопропіл мірістат	Карбо пол 980	0,1N NaOH	Очищена вода
1,20	73,5	1,00	1,0	7,00	16,3
1,40	73,5	1,00	1,0	7,00	16,1
1,60	73,5	1,00	1,0	7,00	15,9

Ще в одному прикладі здійснення композиція містить, приблизно, від 1,22% тестостерону до 1,62% тестостерону, наприклад, близько 1,22% тестостерону, близько 1,42% тестостерону або близько 1,62% тестостерону.

Ще в одному прикладі здійснення композиція містить, приблизно, від 1,15% тестостерону до 1,22% (вага/вага) тестостерону.

Ще в одному прикладі здійснення композиція містить, приблизно, від 1,30% тестостерону до 1,45% (вага/вага) тестостерону.

Ще в одному прикладі здійснення композиція містить, приблизно, від 1,50% тестостерону до 1,70% (вага/вага) тестостерону.

В одному з прикладів здійснення композиція містить, приблизно, від 1,15% до 1,8% (вага/вага) тестостерону; від 0,6% до 1,2% (вага/вага) ізопро-

пілміристату; від 60% до 80% (вага/вага) спирту, вибраного з групи, що складається з етанолу і ізопропанолу; достатньої кількості загусника для надання композиції в'язкості понад 9000 cps (сантипуазів); і воду.

Ще в одному прикладі здійснення композиція містить, приблизно, від 1,15% до 1,8% (вага/вага) тестостерону; приблизно, від 0,6% до 1,2% (вага/вага) ізопропілміристату; приблизно, від 67% до 74% (вага/вага) спирту, вибраного з групи, що складається з етанолу і ізопропанолу; достатньої кількості загусника для надання композиції надмірної в'язкості 9000 cps (сантипуазів); і воду.

Ще в одному прикладі здійснення композиція містить, приблизно, від 1,15% до 1,25% (вага/вага) тестостерону, від 1,30% до 1,45% (вага/вага) тес-

тестостерону або від 1,50% до 1,70% (вага/вага) тестостерону.

В одному з прикладів здійснення в'язкості композиції за даним винаходом складає, приблизно, від 13000 cps (сантипуазів) до 33,000 cps (сантипуазів).

Відповідно, в'язкість композиції за даним винаходом може скласти будь-яку величину від 13000 cps (сантипуазів) до 33000 cps (сантипуазів), наприклад, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000, 20000, 21000, 22000, 23000, 24000, 25000, 26000, 27000, 28000, 29000, 30000, 31000, 32000 або 33000 cps (сантипуазів).

В одному з прикладів здійснення даного винаходу композицію одержують шляхом з'єднання від 1,30% до 1,45% (вага/вага) тестостерону; від 0,6% до 1,4% (вага/вага) ізопропілміристату; приблизно, від 67% до 74% (вага/вага) етанолу; приблизно, від 0,6% до 1,4% (вага/вага) карбомеру; приблизно, від 6,5% до 7,5% (вага/вага) 0,1N NaOH; і додаткову воду.

В одному з прикладів здійснення даного винаходу композицію одержують шляхом з'єднання від 1,50% до 1,70% (вага/вага) тестостерону; від 0,6% до 1,4% (вага/вага) ізопропілміристату; приблизно, від 67% до 74% (вага/вага) етанолу; приблизно, від 0,6% до 1,4% (вага/вага) карбомеру; приблизно, від 6,5% до 7,5% (вага/вага) 0,1N NaOH; і додаткову воду.

Ще в одному з прикладів здійснення даного винаходу композицію одержують шляхом з'єднання від 1,15% до 1,25% (вага/вага) тестостерону; від 0,6% до 1,4% (вага/вага) ізопропілміристату; приблизно, від 67% до 74% (вага/вага) етанолу; приблизно, від 0,6% до 1,4% (вага/вага) карбомеру; приблизно, від 6,5% до 7,5% (вага/вага) 0,1N NaOH; і додаткову воду.

Гель втирається або просто наноситься на ділянку шкіри суб'єкта і висихає. Гель висихає швидко, тобто протягом періоду часу, приблизно, від 30 секунд до 3 хвилин з моменту нанесення на шкіру. Наприклад, гель втирається на верхній зовнішній ділянці шкіри стегна та/або на боці один раз на добу. Після нанесення суб'єкт має руки. Процедура нанесення гелю призводить до підвищення рівня тестостерону, що має заданий фармакокінетический профіль, і ефективного при лікуванні або профілактиці гіпогонадізму і/або стану, викликаного низьким рівнем тестостерону, або симптомів, асоційованих або таких, що відносяться до гіпогонадізму або стану, викликаному низьким рівнем тестостерону в суб'єкта. При цьому дана композиція успішно використовується при лікуванні ряду хвороб або хворобливих станів.

В одному з прикладів даний винахід здійснюється з використанням пакету, що має поліетиленову футеровку, сумісну з компонентами тестостеронового гелю, як буде описано нижче. Пакет може містити одну окрему дозу або множинну дозу.

В іншому прикладі здійснення способи і композиції використовуються з застосуванням композиції, яку відбирають з жорсткого, включаючого безліч доз контейнера (наприклад, за допомогою ручного насоса), забезпеченого наповненим ком-

позицією пакетом з фольги більшого розміру, розташованим усередині контейнера. Такі пакети більших розмірів можуть також мати поліетиленову футеровку, описану вище. В одному з прикладів здійснення мультидозуючий контейнер (з множинним дозуванням) містить вакуумний насос, який включає футеровану поліетиленом упаковку з фольги усередині контейнера (каністри), з вбудованим ручним насосом. В одному з прикладів здійснення упаковка з фольги, футерована поліетиленом, вміщає від 44г до 88г продукту. Ще в одному прикладі здійснення насос може розподіляти (подавати) гель, в цілому, вагою 75г. Ще в одному прикладі здійснення насос перед використанням заправляють, наприклад, насос повністю три рази заправляють методом скидання тиску і вивантажують гель. В одному з прикладів здійснення насос містить достатню кількість продукту для попередньої заправки і заправки деяким числом точних дозувань. Ще в одному з прикладів здійснення кожне скидання тиску (дозована розпиленість) наповненого насоса доставляє 1,25г тестостеронового гелю. В іншому прикладі здійснення доза 3,75г вимагає 3 дозованих розпиленостей насосом (3 скидань тиску в насосі). Доза 5г вимагає 4 дозованих розпиленостей насосом. Доза 7,5г вимагає 6 дозованих розпиленостей насосом. Доза 10г вимагає здійснення 8 дозованих розпиленостей насосом і так далі. Безумовно, кожна дозована розпиленість насосом може доставляти будь-яку кількість тестостеронового гелю, необхідну для введення в організм заданої дози. Розмір упаковки, кількість розподіленого і доставленого об'єму на одне скидання тиску не обмежуються наведеними прикладами здійснення і можуть змінюватися і встановлюватися залежно від особливостей і вимог, продиктованих станом пацієнта.

Порівняно з відомими з рівня техніки, способи і композиції за даним винаходом забезпечують вдосконалені підходи до лікування, профілактики, повернення до первинного стану (відновлення), припинення або уповільнення розвитку гіпогонадізму або інших хвороб, асоційованих з низьким рівнем вмісту тестостерону у суб'єкта, наприклад, у чоловіка.

В одному з прикладів здійснення фармацевтична композиція за даним винаходом приймається один раз, двічі або три рази на добу або стільки разів, скільки це необхідно для досягнення заданого терапевтичного результату. В іншому прикладі здійснення композиція за даним винаходом приймається один раз, двічі або три рази на добу кожний другий день. В іншому прикладі здійснення композиція за даним винаходом приймається один раз, двічі або три рази на день щонеділі, кожні два тижні або кожного місяця.

В одному з прикладів здійснення терапевтична ефективна доза складає, приблизно, від 1,0г до 10,0г, переважно від 1,25г до 6,25г.

Крім того, що даний винахід використовується для лікування людини, воно також успішно застосовується у ветеринарії для лікування ссавців, рептилій, птахів, екзотичних тварин і домашніх тварин, включаючи ссавців, гризунів і інших. В іншому прикладі здійснення ссавці включають при-

матів, наприклад, людину, мавпу або лемуру, коня, собаку свиню або кішку. Ще в одному прикладі здійснення гризуну включають крису, мишу, білку або морську свинку.

Після нанесення на шкіру композиція здатна виділяти стероїд з інтенсивністю і тривалістю в часі, при яких в одному з прикладів здійснення винаходу в сироватку крові пацієнта доставляється, щонайменше, близько 10мкг стероїда на добу.

В іншому прикладі здійснення даного винаходу після нанесення на шкіру пацієнта композиція здатна виділяти тестостерон з інтенсивністю і тривалістю в часі, при яких концентрація тестостерону в циркулюючій сироватці досягає більше 300нг на 1дл сироватки.

В іншому прикладі здійснення даного винаходу після нанесення на шкіру пацієнта композиція здатна виділяти тестостерон з інтенсивністю і тривалістю в часі, при яких концентрація тестостерону в циркулюючій сироватці досягає більше 300нг на 1дл сироватки протягом періоду часу, що починається, приблизно, через 0,5 години і закінчується, приблизно, через 24 годин з моменту нанесення на шкіру.

Ще в одному прикладі здійснення даного винаходу після нанесення на шкіру пацієнта композиція здатна виділяти тестостерон з інтенсивністю і тривалістю в часі, при яких концентрація тестостерону в циркулюючій сироватці досягає величини, приблизно, від 298нг тестостерону на 1дл сироватки до 1043нг тестостерону на 1дл сироватки

В іншому прикладі здійснення даного винаходу після прийому композиції концентрація сироваткового тестостерону підтримується в межах від 400 до 1050нг тестостерону на 1дл сироватки.

В іншому прикладі здійснення даного винаходу після прийому композиції концентрація сироваткового тестостерону підтримується в межах від 200 до 1800нг тестостерону на 1дл сироватки.

В іншому прикладі здійснення даного винаходу після прийому композиції отримане значення  $C_{max}$  складає від 300 до 5000нг/дл.

Ще в одному прикладі здійснення винаходу композиція призначена для щоденного введення в організм пацієнта в дозованій кількості, приблизно, від 1,25г до 3,75г, наприклад, з дозуванням близько 1,25г, або, приблизно, 2,50г, або близько 3,75г. Може вводиться будь-яка інша відповідна доза.

Ще в одному прикладі здійснення даного винаходу пацієнт, потребуючий лікування, має рівень (попередній початку лікування) сироваткового тестостерону перед першим нанесенням композиції за даним винаходом, приблизно, менш ніж 300нг/дл.

В іншому прикладі здійснення даного винаходу після, приблизно, принаймні, 30 днів щоденного прийому композиції за даним винаходом концентрація сироваткового тестостерону в пацієнта складає, принаймні, приблизно, від 300нг/дл до 1050нг/дл, наприклад, від 300нг/дл до 400нг/дл, від 300нг/дл до 500нг/дл, від 500нг/дл до 700нг/дл, від 700нг/дл до 900нг/дл, від 400нг/дл до 500нг/дл, від 500нг/дл до 600нг/дл, від 600нг/дл до 700нг/дл, від 700нг/дл до 800нг/дл, від 800нг/дл до 900нг/дл, від 900нг/дл до 1000нг/дл, від 1000нг/дл до 1100нг/дл,

від 400нг/дл до 1050нг/дл, від 500нг/дл до 1050нг/дл, від 600нг/дл до 1050нг/дл до 700нг/дл до 1050нг/дл.

Ще в одному прикладі здійснення даного винаходу після щоденного прийому композиції за винаходом концентрація загального тестостерону в пацієнта перевищує 300нг/дл. Ще в одному прикладі здійснення даного винаходу загальна концентрація сироваткового тестостерону в пацієнта складає, приблизно, більше 400нг/дл, 600нг/дл, або більше 700нг/дл. Ще в одному прикладі здійснення загальна концентрація сироваткового тестостерону вимірювалася після 24 годин прийому. Ще в одному прикладі здійснення загальна концентрація сироваткового тестостерону вимірювалася після більше 2 днів щоденного прийому, наприклад, після 10 днів, після 14 днів, після 20 днів або після 30 днів.

Ще в одному прикладі здійснення способів, медичних наборів, комбінацій і композицій за даним винаходом композиція за винаходом застосовувалася пацієнтом один раз, двічі або три рази на добу щодня протягом, принаймні, близько 7 днів. Ще в одному прикладі здійснення дана композиція приймалася один раз на добу.

Приклад 1: Розробка поліпшеного тестостеронового гелю (гелів)

Загальна інформація

Для розробки нової композиції тестостеронового гелю проводився цілий ряд досліджень, з метою приготування композиції гелю, що містить різні рівні тестостерону, ізопропілміристату і етилового спирту. Попередні випробування продемонстрували, що в'язкість гелю може бути збільшена при незначному збільшенні концентрації гелеутворюючих і нейтралізуючих речовин.

Дослідження дії трьох інгредієнтів, а саме, тестостерону, етилового спирту і ізопропілміристату на в'язкість і на проникання *in vitro* тестостерону з водоспиртових гелів проводилися на основі статистичної програми. Дослідження проникання *in vitro* проводилися з використанням дифузійних камер (комірок) Франца. Концентрація тестостерону, присутнього в зразках рецептора, була проаналізована за допомогою устаткування високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) або лічильника бета-сцинтиляції (для техніки мічення радіоактивними ізотопами). Грунтуючись на результатах цих досліджень, були приготовані і випробувані методом (HPLC) на проникання через шкіру три оптимізовані композиції. Всі три оптимізовані композиції продемонстрували значне поліпшення показників в'язкості і проникання через шкіру *in vitro*, порівняно з сучасною композицією, відомою на комерційному ринку (1% тестостероновийгель).

Технічна задача

Даний винахід є підсумком досліджень, направлених на створення композиції (композицій) тестостеронового гелю) з поліпшеними показниками в'язкості, зниженням об'ємом нанесення на шкіру, поліпшеним *in vitro* прониканням через шкіру, порівняно з сучасною композицією, відомою на комерційному ринку (1% тестостероновимгелем) і потенційним зниженням об'єму застосування гелю.

Процес здійснення

а. Статистичний проект

Статистичний проект був розроблений (StatGraphics Plus 5.1) для дослідження дії трьох інгредієнтів, а саме, тестостерону, етилового спирту і ізопропілміристату на показники в'язкості і на проникання тестостерону з водоспиртового гелю in vitro. Концентрація двох інших інгредієнтів, Carbopol 980 і розчину гідроокису натрію 0,1N, за-

лишалася постійною. Були отримані наступні результати:

Вид проекту: Чутлива поверхня

Найменування проекту: Проект Vox-Behnken

Число речовин, що беруть участь в експерименті: 3 (всі постійні)

Число блоків: 1; кількість дослідів: 15 (неврегульованих)

Показник вірогідності помилки: 5

Речовина	Нижча межа (%)	Вища межа (%)
Тестостерон	1,33	2,0
Ізопропілміристат	0,5	1,0
Спирт (95% об'єм/об'єм)	72,5	76,1

Наступна таблиця підводить підсумки відносно інгредієнтів випробовуваних композицій, отриманих в результаті реалізації статистичного проекту. Дані композиції були приготовані в кількості 1 кг і

упаковані в скляні банки для проведення аналітичних досліджень і досліджень на проникання через шкіру.

Таблиця 3

Інгредієнти, сполучені для отримання композицій, що тестуються, і контрольної композиції (% вага/вага)

F № (композиція)	T (Тестостерон)	Спирт (95% об'єм/об'єм)	ізопропілміристат	Carbopol 980	0,1N NaOH	Очищена вода
41	1,665	74,3	0,75	1,0	7,00	15,3
42	1,665	72,5	0,50	1,0	7,00	17,3
43	1,665	76,1	0,50	1,0	7,00	13,7
44	2,000	74,3	0,50	1,0	7,00	15,2
45	1,330	74,3	0,50	1,0	7,00	15,9
46	1,330	76,1	0,75	1,0	7,00	13,8
47	2,000	74,3	1,00	1,0	7,00	14,7
48	1,665	74,3	0,75	1,0	7,00	15,3
49	1,330	74,3	1,00	1,0	7,00	15,4
50	2,000	72,5	0,75	1,0	7,00	16,8
51	1,665	76,1	1,00	1,0	7,00	13,2
52	2,000	76,1	0,75	1,0	7,00	13,2
53	1,665	72,5	1,00	1,0	7,00	16,8
54	1,330	72,5	0,75	1,0	7,00	17,4
55	1,665	74,3	0,75	1,0	7,00	15,3
56 (контр.)	1,000	72,5	0,50	0,9	4,75	20,4

б. Аналітичні дослідження

Всі композиції, що тестуються, і контрольні зразки були проаналізовані щодо фізичних (зовнішній вигляд, показник рН і в'язкість) і хімічних (кількісні аналізи на наявність тестостерону, ізопропілміристату і спирту) характеристик.

с. Дослідження проникання через шкіру in vitro

Проникання тестостерону досліджувалося за застосуванням методу кількісного аналізу на людській шкірі, поміщений на дифузійній комірці Франца. Шкіра розміщувалася горизонтально між половиною рецептора і донора. Площа поверхні шкіри, відкрита для дії композиції в камері донора складала 0,64см<sup>2</sup>, об'єм рецептора склав 5,0мл. Температура 37°C підтримувалася, завдяки наявності кожуха з подвійною циркуляцією води, який оточував нижню частину комірки. Камера донора була відкрита у верхній частині.

Спосіб мічення радіоактивними ізотопами.

Композиції, що тестуються, знаходили пікові сплески, що виникають завдяки <sup>14</sup>C-міченому тес-

тостерону. Пікова (мічена радіоактивним ізотопом) композиція (5-15мг гелю, що містить 0,125-0,250μCi (мкКи) гравіметричним способом наносилася на поверхню епідермісу. Зразки з інтервалом 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 22 і 24 години відбиралися від комірки (камери) рецептора для вимірювання радіоактивності/кількості лікарської речовини, що проникла через шкіру. Крім того, визначали кількість мічених ізотопів/лікві, що залишилися на шкірі зразків. Подробиці вказаних експериментів і їх результати представлені в опису прикладу 2.

Метод високоефективної рідинної хроматографії

Композиція (300мг±5%, що містить 3000мкг ліків на основі 1% гелю) гравіметричним способом наносилася на поверхню епідермісу. Періодично (через 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 22 і 24 години) збиралися шари, замінювалися свіжим буферним розчином. Після цього шари досліджувалися на вміст тестостерону. Подробиці вказаних експериментів і їх результати представлені в опису прикладу 3.



## d. Аналіз даних

На додаток до даних, представлених в описах відповідних прикладів, дані, отримані в результаті тестування методом мічення радіоактивними ізотопами і методом вискоефективної рідинної хроматографії (HPLC), були додатково проаналізовані з використанням статистичної програми (StatGraphics Plus 5.1). Програма StatGraphics була також використана для прогнозування оптима-

льних рівнів різних речовин, які можуть забезпечити максимальний ефект.

Результати досліджень і висновки

Аналітичні дані

Всі композиції, що тестуються, були прозорі і мали показник pH 5,68-5,82. Вміст тестостерону, ізопропілміристату і спирту наближався до заданого. Наступна таблиця підводить підсумок результатів аналітичних досліджень через 1 місяць зберігання при 40°C/75% - відносної вологості.

Таблиця 4

Результати аналітичних досліджень випробовуваних композицій і контрольної композиції\*

F № (композиція)	Зовнішній вигляд	pH	В'язкість, cps (сан-типуази)	Аналіз на Т (%)	Аналіз на спирт (95% об'єм/об'єм)	Аналіз на IPM (%)
41	Прозорий гель	5,79	23567	1,69	73,8	0,67
42	Прозорий гель	5,76	26900	1,66	71,8	0,45
43	Прозорий гель	5,82	23000	1,69	75,5	0,44
44	Прозорий гель	5,75	26700	2,00	74,1	0,44
45	Прозорий гель	5,76	25467	1,32	73,7	0,44
46	Прозорий гель	5,69	30233	1,40	74,5	0,74
47	Прозорий гель	5,78	24733	2,02	73,3	0,92
48	Прозорий гель	5,79	24767	1,66	74,3	0,68
49	Прозорий гель	5,76	24300	1,33	73,8	0,93
50	Прозорий гель	5,72	26133	2,02	71,7	0,68
51	Прозорий гель	5,82	20700	1,75	75,4	0,93
52	Прозорий гель	5,83	19733	2,00	75,5	0,68
53	Прозорий гель	5,72	26033	1,68	71,7	0,95
54	Прозорий гель	5,69	28267	1,34	71,9	0,69
55	Прозорий гель	5,79	23567	1,69	73,8	0,67
56 (контрольний)		5,59	22033	1,01	72,4	0,44

\* результати випробувань через 1 місяць зберігання при 40°C/75% - відносній вологості,

T = тестостерон, IPM = ізопропілміристат

Оскільки одною із задач, які вирішують дані дослідження, є підвищення в'язкості гелю, статистичний аналіз (розрахунок) був здійснений для

оцінки дії речовин (тестостерону, ізопропілміристату і етилового спирту), що тестуються на змінну чутливості - в'язкість. Отримані наступні підсумкові аналітичні показники:

Таблиця 5

ANOVA для дослідження показника в'язкості  
Аналіз відхилень (варіацій) по в'язкості

Джерело	Сум. квадр.	Df	Середн., квадр.	Співвідношення - F	Значення Р
A:T	9,41613E6	1	9,41613E6	1,58	0,2488
B:IPM	3,16945E6	1	3,16945E6	0,53	0,4892
C:EtOH	1,94337E7	1	1,94337E7	3,27	0,6379
AA	1,43962E6	1	1,43962E6	0,24	0,6379
AB	3,37413E6	1	3,37413E6	0,57	0,4760
AC	3,50601E7	1	3,50601E7	5,89	0,0456
BB	1,00605E6	1	1,00605E6	0,17	0,6933
BC	1,95303E6	1	1,95303E6	0,33	0,5847
CC	286812,0	1	286812,0	0,05	0,8325
Загальне відхилення	4,16608E7	7	5,95155E6		
Усього (кор.)	1,17733E8	16			

На Фіг.1 показано схематичне зображення А (графік), що представляє тестостерон, В, що представляє ізопропілміристан, С, що представляє EtOH, а також об'єднання букв, що представляють комбінації речовин. З даного графіка витікає, що комбінація із спирту і тестостерону (тобто, АС) надає значної негативної дії показникові в'язкості. Дане спостереження співпадає з висновками попередніх досліджень; для максимізації показника в'язкості рівень спирту повинен бути доведений до найбільш низької допустимої межі.

Дані, що характеризують проникаючу здатність (лікві): Технічні засоби, що забезпечують мічення радіоактивними ізотопами

В дослідженні використані зразки шкіри двох донорів. Для зведення до мінімуму різноманітності між зразками шкіри, дані, що характеризують проникаючу здатність, відсоток проникнення мітки (%LP) з композицій, що тестуються, були нормалізовані відповідно до контрольної композиції, що тестується з відповідною шкірою донора. Додатковий статистичний аналіз проводився на процентне співвідношення проникнення мітки (%LP) (тест./контрольн., Ratio %LP) для визначення напрямів розвитку і оптимальних концентрацій тестостерону, ізопропілміристану і етилового спирту. Отримані наступні підсумкові аналітичні показники:

Таблиця 6

Таблиця даних, отриманих за допомогою мічених радіоактивних ізотопів, які використані для статистичного аналізу\*

F № (композиція)	Донор	T	DPM	Спирт (95%, об'єм/об'єм)	%LP	Співвідношення %LP
41	8127	1,665	0,75	74,3	4,86	0,83
42	8127	1,665	0,50	72,5	3,45	0,59
43	8127	1,665	0,50	76,1	2,7	0,46
44	8127	2,000	0,50	74,3	3,8	0,65
45	8300	1,330	0,50	74,3	3,51	0,46
46	8300	1,330	0,75	76,1	6,37	0,84
47	8300	2,000	1,00	74,3	3,57	0,47
48	8300	1,665	0,75	74,3	5,38	0,71
49	8300	1,330	1,00	74,3	9,47	1,25
50	8300	2,000	0,75	72,5	5,69	0,75
51	8300	1,665	1,00	76,1	6,73	0,89
52	8300	2,000	0,75	76,1	2,22	0,29
53	8300	1,665	1,00	72,5	4,61	0,61
54	8300	1,330	0,75	72,5	4,33	0,57
55	8300	1,665	0,75	74,3	4,33	0,57
56 (конт роль.)	8127	1,000	0,50	72,5	5,87	1,00
56 (конт роль.)	8300	1,000	0,50	72,5	7,56	1,00

\* %LP дані з прикладу 2. Процентне співвідношення мітки, що проникла (Ratio %LP), підраховано із процентних значень %LP. T = тестостерон, IPM = ізофопілміристан, LP = мітка, що проникла

Таблиця 7

ANOVA для процентного співвідношення прониклої мітки (Ratio%LP)  
Аналіз відхилень (варіацій) по в'язкості

Джерело	Сум. квадр.	Df	Середн.кв.адг	F-співвідн.	Знач. Р
A:T	0,213314	1	0,213314	7,19	0,0315
B:IPM	0,107294	1	0,107294	3,62	0,0990
C:EtOH	0,00430679	1	0,00430679	0,15	0,7145
AA	0,119589	1	0,119589	4,03	0,0847
AB	0,131132	1	0,131132	4,42	0,0736
AC	0,0554353	1	0,0554353	1,87	0,2140
BB	0,00724917	1	0,00724917	0,24	0,6363
BC	0,0800686	1	0,0800686	2,70	0,1445
CC	0,00941549	1	0,00941549	0,32	0,5908
Загальне відхилення	0,207716	7	0,0296737		
Усього (кор.)	0,947084	16			

Графік Pareto, представлений на Фіг.2, показує, що рівень тестостерону має значний негативний ефект, тоді як рівень ізопропілміристату має позитивний вплив (статистично незначний) на процентний вміст мітки, що проникла. За наслідками проведених досліджень, передбачається, що максимальний рівень тестостерону в композиції гелю повинен бути нижчим за вищий рівень, показаний в згаданих дослідженнях. За наслідками проведених досліджень, також передбачається, що максимальний рівень ізопропілміристату в композиції гелю повинен наблизитися до щонайвищого рівня, показаного в даних дослідженнях.

Дані, що характеризують проникання: Технічні засоби для здійснення високоефективної рідинної хроматографії (HPLC)

В даних дослідженнях було використано декілька зразків шкіри (двох донорів), що пройшли дослідження з використанням мічення радіоактивними ізотопами. Для зведення до мінімуму чинників різноманітності між зразками шкіри дані, що характеризують проникаючу здатність (потік або кумулятивну кількість витікання (CAR) з композицій, що тестуються, були нормалізовані відповідно до контрольної композиції, що тестується з відповідною шкірою донора. Додатковий статистичний аналіз проводився на співвідношення кумулятивної кількості витікання (CAR) (тест./контроль., Ratio CAR) для визначення тенденцій розвитку і оптимальних концентрацій тестостерону, ізопропілміристату і етилового спирту. Отримані наступні підсумкові аналітичні показники:

Таблиця 8

Даних, отриманих в результаті високоефективної рідинної хроматографії (HPLC), які використані для статистичного аналізу\*

F № (композиція)	Донор	T	IPM	Спирт (95%, об'єм/об'єм)	CAR	Співвідношення CAR
41	8127	1,665	0,75	74,3	189,81	1,02
42	8127	1,665	0,50	72,5	188,21	1,01
43	8127	1,665	0,50	76,1	50,11	0,27
44	8127	2,000	0,50	74,3	151,95	0,82
45	8300	1,330	0,50	74,3	74,13	0,69
46	8300	1,330	0,75	76,1	117,87	1,09
47	8300	2,000	1,00	74,3	114,61	1,06
48	8300	1,665	0,75	74,3	208,82	1,94
49	8127	1,330	1,00	74,3	298,76	1,61
50	8127	2,000	0,75	72,5	94,71	0,51
51	8127	1,665	1,00	76,1	254,57	1,37
52	8127	2,000	0,75	76,1	113,93	0,61
53	8127	1,665	1,00	72,5	326,46	1,76
54	8127	1,330	0,75	72,5	200,45	1,08
55	8127	1,665	0,75	74,3	240,61	1,30
56 (конт роль.)	8127	1,000	0,50	72,5	185,71	1,00
56 (конт роль.)	8300	1,000	0,50	72,5	107,79	1,00

\* T = тестостерон, IPM = ізопропілміристат, CAR = кумулятивна кількість витікання

Таблиця 9

ANOVA для процентного співвідношення кумулятивної кількості витікання (Ratio %CAR)  
Аналіз відхилень (варіацій) по в'язкості

Джерело	Сум. квадр.	Df	Середн.кв.др.	F-співвідн.	Знач. Р
A:T	0,452519	1	0,452519	3,27	0,1135
B:IPM	1,01713	1	1,01713	7,35	0,0302
CrEtOH	0,18431	1	0,18431	1,33	0,2864
AA	0,164241	1	0,164241	1,19	0,3120
AB	0,0291287	1	0,0291287	0,21	0,6603
AC	0,0600202	1	0,0600202	0,43	0,5312
BB	0,000234383	1	0,000234383	0,00	0,9683
BC	0,0737582	1	0,0737582	0,53	0,4891
CC	0,200542	1	0,200542	1,45	0,2678
Заг. відх.	0,968701	7	0,138386		
Усього (кор.)	3,03859	16			

Результати, представлені в таблиці 8 були піддані регресійному аналізу, і був розроблений наступний алгоритм:

Співвідношення  $CAR = 5,1239 - 0,4403 \cdot T + 1,5781 \cdot IPM - 0,0607 \cdot EtOH$

де T - кількість тестостерону % (вага/вага), IPM - кількість ізопропілміристату % (вага/вага), а EtOH - кількість (вага/вага) спирту, 95% об'єм/об'єм.

В одному з прикладів здійснення даного винаходу значення T, IPM і EtOH вибрані з наданого нижче діапазону значень з урахуванням того, що наведений вище алгоритм забезпечує отримання значення співвідношення (коефіцієнту) CAR, що перевищує 1, переважно, більше 1,1, найбільш переважно, більше 2. Передбачені наступні діапазони: від 1,0 до 2,0% (вага/вага) тестостерону, переважно, від 1,15 до 1,8% (вага/вага) тестостерону; від 0,2% до 2,0% (вага/вага) ізопропілміристату, переважно, від 0,6 до 1,2% (вага/вага) ізопропілміристату; і від 60,0% до 80% (вага/вага) спирту 95% об'єм/об'єм, переважно, від 72,5% до 76,1% (вага/вага) спирту, 95% об'єм/об'єм.

Відповідно до графіка Pareto на Фіг.3, статистичний аналіз чітко визначає, що рівень ізопропілміристату надає значну позитивну дію, а рівень тестостерону має негативний (статистично незна-

чний) вплив на співвідношення (коефіцієнт) CAR. Виходячи з Фіг.3, рекомендований максимальний рівень тестостерону в композиції гелю повинен бути нижчим за щонайвищий рівень, представлений в дослідженнях. За наслідками досліджень, максимальний рівень ізопропілміристату в композиції гелю повинен наближатися до щонайвищого рівня, представленого в дослідженнях. Результати проникання, отримані в результаті методу HPLC, цілком співпадають з результатами, отриманими в результаті використання способу мічених радіоактивних ізотопів.

Оптимізація чутливості (реакції) шкіри

Результати дослідження методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) кількісно співпадають з результатами таких же досліджень методом мічення (введення радіоактивних ізотопів). Для зручності дані, отримані в результаті досліджень методом HPLC, були використані для прогнозування (методом статистичної оптимізації) оптимальних рівнів тестостерону, ізопропілміристату і спирту для заданої чутливості. Статистична програма сформувала наступну комбінацію рівнів речовин, дана комбінація максимізувала співвідношення (коефіцієнт) кумулятивної кількості витікання (співвідношення CAR).

Таблиця 10

Оптимізовані рівні речовин для кумулятивної кількості витікання (співвідношення CAR)

Задача: максимізувати коефіцієнт CAR (Ratio CAR)		Оптимальне значення = 1,81748	
Речовина	Нижня межа	Верхня межа	Оптимальне значення
T	1,0	2,0	1,28995
IPM	0,5	1,0	1,0
EtOH	72,5	76,1	73,7366

Фіг.4 і 5 ілюструють вимірючу чутливість (Ratio CAR) щодо заданої комбінації тестостерону і ізопропілміристату при рівні 74,3% (вага/вага) спирту, 95%, об'єм/об'єм.

Вибір композиції

Грунтуючись на графіках чутливості поверхонь і прогнозованих оптимальних рівнях речовин, були вибрані наступні три композиції для подальших досліджень проникання. Для зручності вказані три композиції випробовувалися тільки методом HPLC.

Таблиця 11

Інгредієнти, призначені для складання вибраних композицій і контрольної композиції (% вага/вага)

F № (композиція)	T (тестостерон)	Спирт (95%, об'єм/об'єм)	Ізопропілміристат	Carbopol 980	0,1N NaOH	Очищена вода
57	1,20	73,5	1,00	1,0	7,00	16,3
58	1,40	73,5	1,00	1,0	7,00	16,1
59	1,60	73,5	1,00	1,0	7,00	15,9
56 (контроль)	1,00	72,5	0,50	0,9	4,75	20,4

Наступна таблиця представляє результати первинних (виконуваних після приготування композиції) аналітичних досліджень вибраних композицій.

Таблиця 12

Результати аналітичних досліджень вибраних композицій і контрольної композиції

F № (композиція)	Зовнішній вигляд	pH	В'язкість, cps (сантипуази)	Аналіз на Т (%)	Аналіз на спирт (95% об'єм/об'єм)	Аналіз на ІРМ (%)
57	Прозорий гель	5,66	24500	1,21	73,1	0,94
58	Прозорий гель	5,71	25533	1,42	72,7	0,94
59	Прозорий гель	5,68	24800	1,61	73,3	0,94
56 (контроль)	Прозорий гель	5,57	20267	1,02	71,8	0,43

Наступна таблиця і Фіг.6 представляють підсумкові дані, що характеризують проникання з трьох вибраних композицій (дані для Фіг.6 і таблиці отримані з прикладу 4, таблиць 17-20).

Таблиця 13

Таблиця даних HPLC, використаних для статистичного аналізу\*

Час (год.)	F56 (1% гель)		F57 (1,2% гель)		F58 (1,4% гель)		F59 (1,6% гель)	
	CAR	SD	CAR	SD	CAR	SD	CAR	SD
0	0	0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0
1	0	0	0,5	0,7	0,0	0,0	0,0	0
2	0	0	1,3	0,5	1,3	1,2	0,5	0,3
4	0,40	0,1	4,3	1,3	4,0	1,0	2,9	1,3
6	1,52	0,3	14,2	4,5	11,0	2,7	13,8	4,6
8	6,96	1,5	38,0	11,5	35,9	11,0	43,5	10,8
10	18,35	3,4	57,0	17,9	65,4	14,3	64,5	10,4
22	48,20	12,5	119,2	51,0	129,1	11,8	137,5	30,6
24	50,76	12,3	129,7	50,4	137,0	13,9	156,3	36,4

\* Дані, отримані з Прикладу 4, таблиць 17-20

Всі три вибрані композиції продемонстрували значно поліпшені показники проникання (подвоєна або потрійна кумулятивна кількість витікання), порівняно з контрольним показником. Такі результати підтвердили справедливості висновків, отриманих на підставі первинного скринінгу композицій, і сформували основні критерії для остаточного відбору композицій.

## Висновки

Статистична програма була використана для розробки експериментів на основі трьох ключових чинників (речовин), а саме, на тестостероні, ізопропілміристаті і етиловому спирті. Програма була також використана для аналізу аналітичних даних і даних *in vitro*, що характеризують проникання композицій через шкіру, а також для визначення тенденцій розвитку і наявності оптимальних рівнів кожної з речовин для максимізації чутливості (інтенсивності проникання композиції через шкіру).

Три вибрані композиції тестостеронового гелю мають більш високу в'язкість (приблизно, 4 000 сантипуазів(cps)), ніж контрольна композиція.

Три вибрані композиції тестостеронового гелю продемонстрували значне поліпшення інтенсивності проникання *in vitro* тестостерону через ділянку людської шкіри, на яку були нанесені композиції (в 2-3 рази в порівнянні з контрольним варіантом).

Приклад 2: Дослідження методом мічення радіоактивними ізотопами процесу трансдермальної (черезшкірної) абсорбції *in vitro* через шкіру люди-

ни експериментальних композицій тестостеронового гелю

## Матеріали

Композиції були приготовані і поставлені організацією Solvay Pharmaceuticals.

Тестостерон ( $^{14}\text{C}$ ) був забезпечений American Radiolabeled Chemicals Inc (St Louis, MO). Решту хімічних речовин і реагентів було поставлено затвердженими постачальниками. Матеріали відрізнялися найвищою якістю і надійною чистотою.

## Способи

Опис апаратури з черезшкірними (трансдермальними) дифузійними комітками (камерами).

Використовувана в даному дослідженні апаратура з трансдермальними дифузійними камерами (виробництва PermeGear, Bethlehem, PA) містить до 9 розташованих послідовно дифузійних комірок, при цьому рідкоплинне середовище рецептора перемішується магнітними кульками при швидкості обертання 600об/хвил. Черезшкірна абсорбція *in vitro* піддавалася кількісному аналізу на шкірі людини, розміщеній на дифузійній комірці Франца. Шкіра розміщувалася горизонтально між половинами рецептора і донора. Площа поверхні шкіри, відкрита для дії композиції, в камері донора складала 0,64см<sup>2</sup>, об'єм рецептора складав 5,0мл.

Відділення рецептора було заповнено сіллю, стабілізованою фосфатом, pH 7,4 (PBS), пропіленгліколем (1:1) і гентаміцинсульфатом (50мг/мл). Кожух (37°C) з подвійною циркуляцією води оточує камеру рецептора для підтримки температури шкі-

ри на фізіологічному рівні. Камера донора була відкрита навколишньому середовищу для забезпечення доступу лабораторного повітря до поверхні шкіри. Відносна вологість (RH) зони проведення експерименту (навкруги пристрою з дифузійними комірками) регулювалася для кожного експерименту окремо в діапазоні від 35 до 45% для всіх експериментів.

Дослідження інтенсивності проникання (композиції) в шкіру

Зразок людської шкіри товщиною до 0,3мм (щільна ділянка) виділявся за допомогою дерматому з банку шкіри (US Tissue and Cell (Банк тканин і клітин США), Salt Lake City, Utah), відокремленої від трупів. Шкіра відбиралася протягом 8 годин з моменту смерті донора і заморожувалася в 10% (вага/об'єм) гліцеролі в нормальному сольовому розчині. Шкіра зберігалася при  $-80^{\circ}\text{C}$  аж до моменту використання. В експериментах використовували шкіру двох різних донорів. Кожний експеримент проводили з кожною окремою композицією, принаймні, 6 разів, використовуючи шкіру одного окремого донора. Дані про проникання композиції через шкіру порівнювалися з даними про проникання 1% гелю, відомого на ринку збуту товарів (в 6 повтореннях) і випробуваного на шкірі того ж самого донора, на якому була випробувана композиція, що перевіряється, а всі дані були нормалізовані з урахуванням еталонної (відомий на ринку збуту) композиції.

З цією метою використовували тестостерон, мічений радіоактивними ізотопами ( $^{14}\text{C}$ , специфічна активність 50-60мкКі/ммол (mCi/mmol). Даний продукт поставляється Американською службою хімічних речовин, мічених радіоактивними ізотопами (American Radiolabeled Chemicals) і характеризується 99,5% чистотою, що підтверджено результатами HPLC.

Радіоактивні гелі були приготовані для нанесення від 0,125 до 0,250мкКі ( $\mu\text{Ci}$ ) у мінімальній кількості гелю, який розповсюджується на  $0,64\text{cm}^2$  дифузійній площі комірки Франца (Franz) ( $0,64\text{cm}^2$ ). Мінімальна кількість складала, принаймні, від 5,0 до 15,0мг. Відповідну кількість радіоактивного тестостерону (12,5мкКі ( $\mu\text{Ci}$ ) на 125мкл етанолу) випаровували в колбі з круглим дном до тих пір, доки розчинник повністю не осушувався. В колбу додавали 500мг охолодженої композиції гелю, перемішували протягом 5 хвилин, давали можливість збалансуватися протягом періоду часу від 12 до 16 годин. Потім композицію гелю перемішували протягом 30 хвилин для отримання гомогенної композиції гелю. Рівномірність радіоактивності композиції визначали підрахунком рівнів дев'яти (9) точно зважених (приблизно, 5мг) зразків (стандартів).

Заморожену шкіру відтавали до кімнатної температури, витримуючи шкіру при температурі навколишнього середовища протягом періоду часу від 30 до 45 хвилин. Після цього її обполіскували водою для видалення гліцеролу. Потім шкіру поміщали в PBS (солі, стабілізованій фосфатом), pH 7,4, і акуратно струшували у вібраторі (100об/хв.) протягом 20хв. для видалення слідів гліцеролу. Промиту шкіру утримували на комірках, приблизно, протягом 30 хвилин перед нанесенням компо-

зицій. Композицію (від 5 до 15мг) наносили на поверхню епідермісу гравіметричним способом, використовуючи шприц (для кожного визначення витрачалася кількість гелю, достатня для покриття поверхні, що тестується, і визначали вагу гелю, витраченого для покриття). Періодично зразки витягували з комірки рецептора для вимірювання кількості ліків, перенесених через шкіру (через 1, 2, 4, 6, 8, 10, 22 і 24 години).

Промивка:

Наприкінці випробувань (через 24 години) залишок ліків видаляли з поверхні шкіри, промиваючи її 200мкл різних розчинників відповідно до наступного протоколу:

1-а промивка: спиртовий Cetavlon™ (10/90 об'єм/об'єм)

2-а промивка: вода

3-а промивка: спиртовий Cetavlon™ (10/90 об'єм/об'єм) 4-а промивка: вода 5-а промивка: вода.

Після цього оброблена зона витиралася паличкою з ватним тампоном на кінці (Q-наконечником). Промивальні матеріали, ватний тампон і донорська комірка поміщалися в 20мл етанолу для виведення всієї радіоактивності в етанол. Оброблена зона була зібрана дерматомом. Для аналізу латеральної дифузії латеральні ділянки шкіри збиралися і досліджувалися на показник радіоактивності, з метою складання масового балансу експериментів.

Шкіра на ділянці активної дифузії, а також латеральна шкіра подрібнювалася на дрібні фрагменти спеціальними гострими ножицями (Sigma), піддавалася переробці для усунення радіоактивності за допомогою 3мл Soluene 350™ (PACKARD) протягом 12 годин.

Радіоактивність, що міститься в зразках, отриманих відповідно до раніше описаної методики, вимірювалася у всій повноті зразків або в зважених аліквотах, використовуючи сцинтиляційний рідинний бета-лічильник, оснащений відповідним програмним забезпеченням

Проводилася оцінка стандартних зразків (0,5мл/5мл Picofluor40™), рецепторного середовища (1,0мл/10мл Picofluor 40™) і точно зваженої аліквоти етанолового розчину, що містить мючі розчинники (0,5мл/5мл Picofluor 40™).

Після переробки до епідермісу і дермісу додавали 15мл Hionic Fluor 30™ (PACKARD). Рахунок імпульсів радіоактивного фону автоматично віднімався з інтенсивності рахунку для кожного зразка в кількості рахунків в хвилину (dpm (число розпадів в хвилину)).

Аналіз даних:

Результати виражалися кількісно або у вигляді процентного вмісту використаного тестостерону, знайденого в різних комірках. Введені кількості тестостерону визначалися з рівнів підрахунків розбавлених еталонів. Кожний результат представляє собою середнє значення шести експериментальних детермінацій і асоційованих із стандартною погрешністю середнього значення.

1. Кількість тестостерону і процентний вміст (%) поглиненої дози в середовищі рецептора для кожного моменту часу розраховувалися по наступному рівнянню:

$$\% = (Q_t / Q_i) \times 100$$

де  $Q_t$  є поглиненою кількістю при значенні часу  $t$ , а  $Q_i$  є нанесеною кількістю при значенні часу 0

2. Загальна кількість і відповідний процентний вміст поглиненої дози є функцією часу (кумулятивні значення)

3. Середнє значення потоку тестостерону, що проник в організм, розраховувалося як тангенс кута нахилу (кутовий коефіцієнт) лінійної ділянки графіка залежності  $Q$  - час і мало вид  $\text{мкКі/см}^2/\text{час}$  ( $\mu\text{Ci/cm}^2/\text{h}$ )

4. Визначалися кількість і процентний вміст введеної дози, які були знайдені в шкірі і в промиловальних розчинниках.

Справедливість тестування перевірялася урівноваженням радіоактивності, знайденої в різних зразках (для кожного тестування підсумкове значення повинне знаходитися в діапазоні від 90% до 110% від введеної дози).

Результати і підведення підсумків

Таблиця 14 показує, що композиції F45, F47, F52, F53, F54 і F55 вводять набагато меншу кількість тестостерону, ніж F56 ( $P < 0,001$ ). Що стосується композицій F41, 42, 43, 44, 46, 48, 50, 51, то введені кількості нижчі, ніж для F56. Проте відмінності між даними композиціями і F56 не були у великій мірі статистично відчутними ( $P > 0,05$ ). Проте, F49 відрізняється більшим прониканням, ніж F56, але відмінності між цими двома композиціями були статистично незначними ( $P > 0,05$ ). Дані про рівновагу мас указують на мінливість рівнів утримування наявності тестостерону в шкірі. Крім того, вказані дані також демонструють, що загальна рівновага мас складає від 90% до 110% від початкової кількості введеного  $^{14}\text{C}$  тестостерону (Таблиця 14).

Хоча потік композицій F41, F42, 46, F49 і F50 і є вищим порівняно з F56, відмінності між ними статистично незначні ( $P > 0,05$ ). Потоки решти композицій також виявилися нижчими за контрольні, при цьому відмінності між композиціями відносно F56 були статистично незначними, за винятком F45 ( $P > 0,05$ ).

Виходячи з результатів даного дослідження, ясно, що інтенсивність і обширність проникання тестостерону крізь шкіру людини для всіх композицій, що тестуються, були нижчими (або однаковими, в окремих випадках), ніж в посилованій (еталонній) композиції, і жодна з композицій, що тестуються, не продемонструвала інтенсивності проникання, яка виявилася б в значній мірі більш високою, ніж інтенсивність проникання еталонної композиції (F56).

Обмеженнями для досліджень потоку було наступне: дослідження, що проводяться, були засновані на кінцевих кінетичних характеристиках дози, при яких обмежуючим інтенсивність моментом була кількість використаного гелю. Завдяки використуванню принципу кінцевої (граничної) дози, був досягнутий нелінійний профіль проникання для більшості композицій, відносно яких виникала проблема з розрахунком потоку в стаціонарному (стабільному) стані. Проте, були використані 2-10 годинні моменти часу для розрахунку значень потоку, що є швидше припущенням лінійної прогресії, що характеризує потік, а не віддзеркаленням дійсності. Насправді ж, стабільного стану в приведених експериментах досягнуто не було. Отже, значення AUC (розрахунку атомних одиниць) є більш репрезентативними для порівняння композицій, ніж значення, що характеризують потік.

Таблиця 14

#### Дослідження рівноваги мас

##### ДОНОР 8127

	F41		F42		F43		F44		F56	
	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD
% у промивочн. середовищі	72,84	19,88	82,63	12,27	95,46	08,71	92,22	03,68	92,01	13,45
% у зоні латеральної шкіри	01,15	02,14	00,27	00,18	00,31	00,41	00,36	00,29	00,59	00,40
% у центр зоні шкіри	10,57	04,50	06,38	05,27	04,18	01,14	05,80	02,28	03,52	02,39
% проникання	04,86	01,53	03,45	00,43	02,70	00,70	03,80	02,05	05,87	05,05
% в цілому	89,42		92,73		102,65		102,18		101,99	

##### ДОНОР 8300

	F45		F46		F47		F48		F56	
	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD
% у промивочн. середовищі	95,41	05,29	86,91	03,16	87,98	13,59	79,68	07,41	86,08	03,67
% у зоні латеральної шкіри	00,24	00,14	00,42	00,17	00,14	00,08	00,25	00,10	00,21	00,09
% у центр зоні шкіри	04,09	02,05	04,67	01,84	02,29	00,84	04,88	02,76	04,07	01,59
% проникання	03,51	01,65	06,37	03,98	03,57	01,25	05,38	03,81	07,56	01,78
% в цілому	103,25		98,37		93,98		90,19		97,92	

## ДОНОР 8300

	F49		F50		F51		F52		F56	
	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD
% у промивочн. середовищі	79,64	05,61	88,34	02,30	91,04	08,28	95,51	04,07	86,08	03,67
% у зоні латеральної шкіри	00,41	00,24	00,29	00,25	00,54	00,59	00,23	00,21	00,21	00,09
% у центр зоні шкіри	08,29	02,69	05,70	02,12	06,58	01,92	02,67	00,84	04,07	01,59
% проникання	09,47	02,14	05,69	01,72	06,73	02,28	02,22	00,40	07,56	01,78
% в цілому	97,82		100,01		104,89		100,67		97,92	

## ДОНОР 8300

	F53		F54		F55		F56	
	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD	Середнє, значення	SD
% у промивочн. середовищі	85,33	04,58	87,39	04,37	90,02	02,64	86,08	03,67
% у зоні латеральної шкіри	00,20	00,08	00,35	00,33	00,09	00,05	00,21	00,09
% у центр зоні шкіри	09,14	02,93	05,88	03,69	04,37	03,29	04,07	01,59
% проникання	04,61	00,62	04,33	00,68	04,33	00,68	07,56	01,78
% в цілому	99,28		97,953 7		98,81		97,92	

Приклад 3: Дослідження методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) трансдерманої (черезшкірної) абсорбції експериментальних композицій тестостеронового гелю крізь людську шкіру in vitro.

## Методи

Людська шкіра: Заморожена людська шкіра поставлялася банком клітин і тканин США (U.S. Tissue and Cell (Cincinnati, OH)). Шкіра відправлялася на сухому льоду і відразу після отримання зберігалася при  $-80^{\circ}\text{C}$  аж до використання. Середня товщина відсіченої шкіри складала 540мкм. Кожний експеримент проводився з шістьма ( $n=6$ ) повтореннями і з використанням одного і того ж донора для кожної окремої композиції. Крім того, кожний донор тестувався на проникання 1% гелю, існуючого на ринку збуту (F56), з трьома повтореннями, причому всі дані приводилися у відповідність з даним вимірюванням.

Композиції: Композиції були приготовані і поставлені Solvay Pharmaceuticals. Композиції були скритними, за винятком контрольної композиції/формули продукту, відомого на ринку збуту (F56).

Дослідження способу введення продукту в організм: Черезшкірне поглинання in vitro досліджувалося по кількісному методу на людській шкірі, поміщений на дифузійній комірці (камері) Франца (Franz). Шкіра розміщувалася горизонтально між половинами рецептора і донора. Площа поверхні шкіри, відкрита для дії композиції в камері донора складала  $0,64\text{cm}^2$ , об'єм рецептора складав 5,0мл. Температура підтримувалася на рівні  $37^{\circ}\text{C}$ , завдяки використуванню оболонки з подвійною циркуляцією води, оточуючої нижню частину комірки. Це забезпечувало підтримку температури шкіри на фізіологічному рівні. Камера донора була відкрита у верхній частині.

Відділення рецептора було заповнено плинним середовищем рецептора, що складається з солі, стабілізованої фосфатом (PBS), pH 7,4, і

пропіленгліколем (1:1). Шкіру розміщували на комірках, приблизно, за 30 хвилин до нанесення композицій. Композиція ( $300\text{mg}\pm 5\%$ , що включають  $3000\text{мкг}$  ліків на 1% основі гелю) наносилася на поверхню епідермісу гравіметричним способом. Зразки об'ємом 0,3мл періодично відбиралися (через 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 22 і 24 години) і замінювалися свіжим буферним розчином.

Дослідження: Зразки досліджувалися на вміст тестостерону, використовуючи метод високоефективної рідинної хроматографії (HPLC).

Дослідження проводилися на наступних режимах:

Мобільна фаза: ацетонітрил:вода (50:50)

Колонка: C18, 3мк, 150мм Phenomenex (Nucleosil)

Об'єм уприскування: 30мкл

Витрата: 1мл/хв.

Виявлення UV: 239nm

Результати

Відповідно до таблиці 15, результати були надані у вигляді кумулятивних кількостей прониклого в організм тестостерону, залежно від різної тривалості періоду проникання для різних композицій. Таблиця демонструє кумулятивну кількість проникання щодо контрольного зразка/формули продукту, відомого на ринку збуту і використаного для одного і того ж донора людської шкіри. Середній показник, що характеризує потік проник тестостерону, розраховувався із співвідношення кутового коефіцієнта лінійної ділянки, що характеризує CAR (кумулятивну кількість витікання) і даних кривої часу і може бути представлений як  $\text{мкг}/\text{см}^2/\text{год}$ . Результати були виражені у вигляді співвідношення потоків досліджуваної композиції і контрольної композиції (досліджувана композиція/контрольна композиція). Кумулятивна кількість ліків, що проникли в організм через шкіру на одному квадратному сантиметрі шкіри, порівнювалася також з подібними показниками композиції, відомої на ринку збуту, і була представлена у вигляді співвідно-



шення (досліджувана композиція/контрольна композиція). Таким чином, кожна композиція порівнювалася з композицією, існуючою на ринку збуту, щодо її кумулятивного проникання і величин, що характеризують потік, а результати порівняльного аналізу заносилися в таблицю 15. Порівняння кожної досліджуваної композиції з композицією ринкового продукту проводилося для визначення статистичної значущості, використовуючи ANOVA. Середні показники відмінності при  $p < 0,05$  признавалися статистично значущими. Необроблені дані, що характеризують кожну з досліджуваних композицій у відношенні до композиції ринкового продукту показують потік і кумулятивну кількість витікання

CAR, а також є основою для статистичної оцінки.

#### Висновки

Проникання тестостерону через відсічену (дерматовану) людську шкіру вивчалася для всіх композицій і склало від 1 до 7%, залежно від композиції.

Згідно з даними таблиці 15, можна зробити висновки про те, що поліпшений показник проникання відносно композиції ринкового продукту, як було визначено в результаті порівняння кумулятивної кількості ліків, що проникли в організм через 24 години, та/або потоку при статистично значущих рівнях, був знайдений для композицій F48, F49 і F53.

Таблиця 15

Композиція	Донор	Потік (мкг/см <sup>2</sup> /год)	Кумулятивна кількість витікання (CAR), мкг	Відносне стандартне відхилення (SD/середнє значення), *100)	Коефіцієнт потоку	Коефіцієнт CAR	Статистичне поліпшення в порівнянні з риночною композицією	
							Коефіцієнт потоку	Коефіцієнт CAR
F41 (n=4)	8127	13,03	189,81	11,87	0,65	1,02	Ні	Ні
F42 (n=5)	8127	10,944	188,21	55,52	0,54	1,01	Ні	Ні
F43 (n=6)	8127	3,44	50,11	23,91	0,17	0,27	Ні	Ні
F44 (n=6)	8127	10,57	151,95	22,05	0,53	0,82	Ні	Ні
F45 (n=6)	8300	5,95	74,13	29,00	0,47	0,69	Ні	Ні
F46 (n=6)	8300	11,16	117,87	22,60	0,88	1,09	Ні	Ні
F47 (n=6)	8300	10,85	114,61	22,57	0,86	1,06	Ні	Ні
F48 (n=6)	8300	20,53	208,82	39,5	1,62	1,94	Так	Так
F49 (n=6)	8127	20,34	298,76	18,70	1,01	1,61	Ні	Так
F50 (n=6)	8127	6,78	94,71	28,76	0,34	0,51	Ні	Ні
F51 (n=6)	8127	21,37	254,57	29,68	1,06	1,37	Ні	Ні
F52 (n=6)	8127	8,18	113,93	40,08	0,41	0,61	Ні	Ні
F53 (n=6)	8127	24,04	326,46	28,49	1,19	1,76	Ні	Так
F54 (n=6)	8127	14,75	200,45	37,80	0,73	1,08	Ні	Ні
F55 (n=4)	8127	16,67	240,61	27,58	0,83	1,30	Ні	Ні
F56 (n=3)	8127	20,13	185,71	23,15	NA	NA	NA	NA
F56 (n=3)	8300	12,69	107,79	7,00	NA	NA	NA	NA

Приклад 4: Дослідження методом вискоефективної рідинної хроматографії (HPLC) черезшкірної абсорбції трьох композицій тестостеронового гелю крізь людську шкіру in vitro.

#### Методи

Людська шкіра: Заморожена людська шкіра поставлялася банком клітин і тканин США (U.S. Tissue and Cell (Cincinnati, OH)). Шкіра відправлялася на сухому льоду і відразу після отримання зберігалася при -80°C аж до використання. Середня товщина відсіченої шкіри складала 700мкм. Кожний експеримент проводився з шістьма (n=6) повтореннями і з використанням одного і того ж донора для кожної окремої композиції. Крім

того, проводилося тестування проникання тестостеронового гелю ринкової формули (1%, F56) також з шістьма (n=6) повтореннями, причому всі дані приводилися у відповідність з названим вимірюванням.

Композиції: Композиції були приготовані і поставлені Solvay Pharmaceuticals. Композиції були утаємненими, за винятком контрольної композиції/формули продукту, відомого на ринку збуту (F56).

Дослідження способу введення продукту в організм: Черезшкірне поглинання in vitro досліджувалося по кількісному методу на людській шкірі, поміщеній на дифузійній комірі (камері) Франца

(Franz). Шкіра розміщувалася горизонтально між половинами рецептора і донора. Площа поверхні шкіри, відкрита для дії композиції в камері донора складала  $0,64\text{см}^2$ , об'єм рецептора складав  $5,0\text{мл}$ . Температура підтримувалася на рівні  $37^\circ\text{C}$ , завдяки використуванню оболонки з подвійною циркуляцією води, оточуючої нижню частину комірки. Це забезпечувало підтримку температури шкіри на фізіологічному рівні. Камера донора була відкрита у верхній частині.

Відділення рецептора було заповнено плинним середовищем рецептора, що складається з солі, стабілізованої фосфатом (PBS), pH 7,4, і пропіленгліколем (1:1). Шкіру розміщували на комірках, приблизно, за 30 хвилин до нанесення композицій. Композиція ( $300\text{мг}\pm 5\%$ , що включає  $3000\text{мкг}$  ліків на  $1\%$  основі гелю) наносилася на поверхню епідермісу гравіметричним способом. Зразки об'ємом  $0,3\text{мл}$  періодично відбиралися (через 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 22 і 24 години) і замінювалися свіжим буферним розчином.

Дослідження: Зразки досліджувалися на вміст тестостерону, використовуючи метод вискоефективної рідинної хроматографії (HPLC).

Дослідження проводилися на наступних режимах: Мобільна фаза: ацетонітрил:вода (50:50)

Колонка: M18, 3мк, 150мм Phenomenex (Nucleosil)

Об'єм уприскування: 30мкл

Витрата: 1мл/хв.

Виявлення UV: 239нм

Результати

У відповідності з Фіг.7-9 і таблицями 17-20, результати були надані у вигляді кумулятивних кількостей проникання в організм тестостерону, залежно від різної тривалості періоду проникання різних композицій. Кожна таблиця демонструє кумулятивну кількість проникання відносно контрольного зразка/формули продукту, відомого на ринку збуту і використаного для одного і того ж донора людської шкіри. Середній показник, що характеризує потік прониклого тестостерону, розраховувався із співвідношення кутового коефіцієнта лінійної ділянки, що характеризує CAR (кумулятивну кількість витікання (із композиції), і даних кривої часу, і був представлений як  $\text{мкг}/\text{см}^2/\text{год}$ . Результати були виражені у вигляді співвідношення потоку досліджуваної композиції і контрольної композиції (досліджувана композиція/контрольна композиція). Кумулятивна кількість ліків, що про-

никли в організм через шкіру на одному квадратному сантиметрі шкіри, порівнювали також з подібними показниками композиції, відомої на ринку збуту, і представляли у вигляді співвідношення (досліджувана композиція/контрольна композиція). Таким чином, кожна композиція порівнювалася з композицією, існуючою на ринку збуту, відносно її кумулятивного проникання і величин, що характеризують потік, а результати порівняльного аналізу заносилися в таблицю 16. Порівняння кожної досліджуваної композиції з композицією ринкового продукту проводилося з використанням ANOVA для визначення статистичної значущості. Середні показники відмінності при  $p<0,05$  признавалися статистично значущими.

#### Висновки

Проникання тестостерону через відсічену людську шкіру вивчалася на всіх трьох композиціях і склало близько 3% (CAR).

Поліпшений показник проникання відносно композиції ринкового продукту, як було визначено в результаті порівняння кумулятивної кількості ліків, що проникли в організм через 24 години, та/або потоку при статистично значущих рівнях, був знайдений для усіх композицій F57, F58 і F59, що досліджувалися.

Отже, ґрунтуючись на сукупності істотних ознак, розкритих в цьому документі, водоспиртовий гель, що містить тестостерон, ізопропілміристат, етанол, воду і достатню кількість загусника для надання гелю в'язкості понад 9000 сантипуазів (cps), може бути приготований таким чином, що, будучи нанесеним на людську шкіру, розміщену в комірці Франца в кількості близько 300мг, через 24 години набуде коефіцієнту потоку понад 1 або, переважно, понад 1,5, де термін "коефіцієнт потоку" означає відношення потоку тестостерону, виражене як кількість тестостерону яка проникає через шкіру на одиниці площі і в одиницю часу, коли вказаний гель досліджується по згаданій вище методиці, до потоку тестостерону, який проникає через шкіру, коли піддається випробуванню гель такої ж в'язкості, що містить 1 ваговий відсоток тестостерону, 0,5 вагового відсотку ізопропілміристату і 72,5 вагових відсотків спирту, 95%, об'єм/об'єм. Водоспиртовий гель має від 1,15 до 1,8% (вага/вага) тестостерону; від 0,6 до 1,2% (вага/вага) ізопропілміристату і від 72,0 до 78,0% (вага/вага) спирту, 95%, об'єм/об'єм.

Таблиця 16

Дані, що характеризують проникання тестостерону через шкіру з досліджуваних тестостеронових композицій (F57, F58 і F59) і з контрольної композиції (F56) через 24 години після нанесення композиції

Композиція	Донор	Потік (мкг/см <sup>2</sup> /год)	Кумулятивна кількість ви- ткання (CAR), мкг	Відносне стандартне відхилення (SD/сере- дає значен- ня),*100)	Коефіцієнт потoku	Коефіцієнт CAR	Статистичне поліп- шення в порівнянні з риночною композицією	
							Коефіцієнт потoku	Коефіцієнт CAR
Контроль на F56 (n=6)	8126	4,20	50,76	26,08	-	-		
F57 (n=6)	8126	10,69	129,66	41,77	2,55	2,55	Так	Так
F58 (n=6)	8126	8,70	136,98	10,88	2,07	2,70	Так	Так
F59 (n=6)	8126	12,67	156,32	15,25	3,02	3,08	Так	Так

Таблиця 17

Дані, що характеризують проникання тестостерону через шкіру із контрольної композиції (F56)

Час, го- дина.	Контрольні значення (підррахунки площі)	Cone (кон- центр.) (мкг/мл)	Cone (кон- центр.)X Dil (роз- чин)	Cone (кон- центр.) *0,3	Загальна кількість (5мл)	Cum (куму- лят.), мкг	Cum (ку- мулят.), кв.см	SD (стан- дартне відхи- лення)	Потік (коэф. потoku) (мкг/кв.см/год)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4,00	4137,83	0,05	0,05	0,02	0,25	0,25	0,40	0,10	0,20
6,00	15522,67	0,19	0,19	0,06	0,96	0,97	1,52	0,30	0,56
8,00	71183,00	0,88	0,88	0,26	4,38	4,46	6,96	1,49	2,72
10,00	185241,67	2,28	2,28	0,68	11,41	11,74	18,35	3,37	5,69
22,00	484302,17	5,97	5,97	1,79	29,83	30,85	48,20	12,49	2,49
24,00	481870,50	5,94	5,94	1,78	29,68	32,49	50,76	12,29	1,28

Таблиця 18

Дані, що характеризують проникання тестостерону через шкіру із досліджуваної композиції (F57)

Час, година.	Контрольні значення (підррахунки площі)	Cone (кон- центр.) (мкг/мл)	Cone (кон- центр.)X Dil (роз- чин)	Cone (кон- центр.)*0,3	Загальна кількість (5мл)	Cum (куму- лят.), мкг	Cum (куму- лят.), кв.см	SD (стан- дартне відхилен- ня)	Потік (коэф. потoku) (мкг/кв.см/год)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	51,71	0,06	0,06	0,02	0,31	0,31	0,48	0,73	0,48
2,00	13574,00	0,16	0,16	0,05	0,81	0,83	1,30	0,53	0,82
4,00	45117,33	0,54	0,54	0,16	2,71	2,77	4,33	1,29	1,52
6,00	147837,67	1,77	1,77	0,53	8,87	9,10	14,21	4,45	4,94
8,00	393201,67	4,72	4,72	1,42	23,58	24,35	38,04	11,49	11,91
10,00	571442,33	6,86	6,86	2,06	34,28	36,45	56,96	17,86	9,46
22,00	1201173,50	14,41	14,41	4,32	72,05	76,28	119,19	50,99	5,19
24,00	1240824,00	14,89	14,89	4,47	74,43	82,98	129,66	50,45	5,24

Таблиця 19

Дані, що характеризують проникання тестостерону через шкіру із досліджуваної композиції (F58)

Час, година	Контрольні значення (підрахунки площі)	Cone (кон-центр.) (мкг/мл)	Cone (кон-центр.)X Dil (розчин)	Cone (кон-центр.)*0,3	Загальна кількість (5мл)	Cum (кумулят.), мкг	Cum (кумулят.), кв.см	SD (стандартне відхилення)	Потік (коэф. потоку) (мкг/кв.см/год)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,00	13377,80	0,16	0,16	0,05	0,80	0,80	1,25	1,23	1,25
4,00	41996,33	0,50	0,50	0,15	2,52	2,57	4,01	1,03	1,38
6,00	114316,67	1,37	1,37	0,41	6,86	7,06	11,03	2,71	3,51
8,00	372728,67	4,47	4,47	1,34	22,36	22,97	35,89	10,99	12,43
10,00	665420,00	7,98	7,98	2,39	39,91	41,86	65,41	14,32	14,76
22,00	1304913,50	15,65	15,65	4,70	78,27	82,62	129,09	11,80	5,31
24,00	1123168,83	15,72	15,72	4,72	78,62	87,67	136,98	13,89	3,95

Таблиця 20

Дані, що характеризують проникання тестостерону через шкіру із досліджуваної композиції (F59)

Час, година	Контрольні значення (підрахунки площі)	Cone (кон-центр.) (мкг/мл)	Cone (кон-центр.)X Dil (розчин)	Cone (кон-центр.)*0,3	Загальна кількість (5мл)	Cum (кумулят.), мкг	Cum (кумулят.), кв.см	SD (стандартне відхилення)	Потік (коэф. потоку) (мкг/кв.см/год)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,00	5610,17	0,07	0,07	0,02	0,35	0,35	0,54	0,25	0,54
4,00	30049,67	0,37	0,37	0,11	1,86	1,88	2,94	1,34	1,20
6,00	140427,33	1,74	1,74	0,52	8,69	8,82	13,79	4,64	5,42
8,00	439193,83	5,44	5,44	1,63	27,18	27,83	43,49	10,80	14,85
10,00	629849,83	7,80	7,80	2,34	38,98	41,26	64,47	10,42	10,49
22,00	1346943,00	16,67	16,67	5,00	83,36	87,98	137,47	30,64	6,08
24,00	1461065,83	18,08	18,08	5,43	90,42	100,05	156,32	36,38	9,43

Приклад 5: Фармакокінетика одиної і множинної дози тестостерону після прийому 1,62% водоспиртового гелю при рівнях дозувань 1,25, 2,50, 3,75, 5,00 і 6,25г у гіпогонадальних чоловіків

Вирішувати технічні задачі:

Визначення фармакокінетики одиної і множинної дози тестостерону після прийому 1,62% тестостеронового гелю при дозуваннях 1,25г (20,3мг, 2,50г (40,5мг), 3,75г (60,8мг), 5,00г (81,0мг) і 6,25г (101,3мг).

Визначення пропорційності дозування і акумуляції тестостерону у діапазоні дозування від 1,25г (20,3мг) до 6,25 г (101,1мг) 1,62% тестостеронового гелю.

Методи

Композиції: Композиції готувалися і поставлялися Solvay Pharmaceuticals. Композиції були утаємненими, за винятком контрольної композиції/формули ринкового продукту.

Планування експерименту: Місце проведення експерименту - єдиний центр: рандомізоване одинокне і множинне дозування з доступною для ока етикеткою; паралельні групові дослідження гіпогонадальних чоловіків. Обстежувані особи, слідує принципу рандомізації, включалися в одну з п'яти лікувальних груп. Кожна група складалася з 12

чоловік. Всього в експерименті брали участь 60 чоловік.

Особи, що погодилися взяти участь в експерименті і пройшли відбір по критеріях включення/виключення, були рандомізовані в одну з наступних лікувальних груп:

Таблиця 21

Лікувальні групи		
Лікувальна група	Доза гелю (г)	Доза тестостерону (мг)
A	1,25	20,3
B	2,50	40,5
C	3,75	60,8
D	5,00	81,0
E	6,25	101,3

Кожний пацієнт отримав одинокну дозу (день 1) і множинну дозу (дні 2-14) 1,62% тестостеронового гелю протягом 14-денного періоду лікування. Досліджувані ліки наносилися локально щодня, один раз в день - вранці. Загальна тривалість дослідження склала 17 днів, включаючи скринінговий період. Учасники експерименту були госпіталізовані для клінічного обстеження на весь 17-денний

період дослідження. Наступна таблиця представляє перелік інгредієнтів, що входять до складу використаної в дослідженні композиції.

Таблиця 22

Інгредієнти, що входять до складу використовуваної в дослідженні композиції (% вага/вага)

Компонент	Функція	% вага/вага
Тестостерон	Активний фармацевтичний інгредієнт	1,62
Спирт (95% об'єм/об'єм)*	Підсилювач поглинання	73,5
Ізопропілмірилат	Підсилювач поглинання	1,00
Carbopol 980	Прекурсор загусника	1,00
0,1N гідроксид натрію	Нейтралізатор	7,00
Очищена вода	Розчинник	15,9

\* Еквівалентно, приблизно, 68,1% абсолютного спирту в композиції

Пацієнти: П'ятдесят шість (56) гіпогонадальних чоловіків

Основні критерії для включення в експеримент: чоловіки 18-75 років, включно; загальний сироватковий тестостерон <300нг/дл при скринінгу за наслідками клінічної лабораторії; і пацієнти з індексом маси тіла від 20-35кг/м<sup>2</sup>, включно.

Методика досліджень і оцінка результатів

Введення дози: 1,62% тестостероновий гель наносився локально один раз на добу, вранці, протягом 1-14 днів. Місцем нанесення геля було або плече/верхня частина передпліччя, або живіт. Досліджувані ліки наносилися з прирощенням 1,25г до досягнення загальної призначеної дози, використовуючи максимально допустиму ділянку поверхні.

За двадцять (20) хвилин до призначеного часу нанесення дози пацієнти приймали душ і промивали ділянку нанесення композиції водою з милом. Учасникам експерименту не дозволялося знаходитися в душі довше 10 хвилин. Ділянка, призначена для нанесення гелю, ретельно осушувалася.

Медичний персонал, запрошений безпосередньо до процедури дозування, працював в рукавичках. Свіжа пара рукавичок також призначалася для кожного з учасників експерименту. Доза гелю для кожного прирощення 1,25г±0,02г зважувалася на листі паперу для зважування на терезах. Відразу ж після зважування потрібної кількості гелю папір для зважування із зваженою дозою гелю нашлюпувався медичним персоналом, відповідальним за проведення експерименту, безпосередньо, на позначене місце обстежуваного пацієнта. Після цього

го учасник експерименту рукою втирав продукт в шкіру на позначеній ділянці. Цей процес повторювався до тих пір, доки вся призначена доза (від 1,25г до 6,25г) не була введена в організм.

Фармакокінетичний відбір зразків: Всі зразки крові (10мл кожний) були узяті в кожного пацієнта для визначення загального тестостерону, дигідротестостерону і естрадіолу в наступні моменти часу:

- День 1: момент перед нанесенням дози, 0,5; 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, і 16 годин відносно призначеного часу нанесення гелю в наступні дні дослідження
- День 1: перед нанесенням дози, 0,5; 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, і 16 годин після нанесення дози;
- Дні 2-13: перед нанесенням дози;
- День 14: перед нанесенням дози, 0,5; 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, і 24 годин після нанесення дози.

Біоаналіз: Концентрації сироватки загального тестостерону, дигідротестостерону і естрадіолу визначалися з використанням існуючої методології LC-MS/MS.

Критерії оцінки

Нешкідливість: показники життєво важливих функцій, ECG (електрокардіограма), фізичні дослідження, клінічні лабораторні аналізи (включаючи вимірювання PSA (аналіз методом фазової розчинності), DRE (методом перехресних реакцій) і IPSS, визначення нешкідливості тестостерону і вимірювання гематокритного числа.

Фармакокінетика: Для попереднього звіту фармакокінетичні параметри (AUC(0-24), C<sub>макс</sub>, Серед, C<sub>мін</sub>, пік до крізової флуктуації, T<sub>мін</sub> і T<sub>макс</sub>) одержували від спостережуваних при дослідженнях і відкоригованих по базовій лінії сироваткових концентрацій тестостерону.

Статистичні методи: Описова статистика (n, середнє значення (статистичне), SD (стандартне відхилення (погіршність), CV, серединний показник, середнє геометричне, мінімум, максимум) і графічні зображення.

Таблиця 23

Демографічні дослідження пацієнтів (середні значення (діапазон))

Лікувальна група	N	Вік (роки)	ВМ (кг/м <sup>2</sup> )
A (1,25г)	11	50 (27-69)	30,4 (25,6-33,6)
B (2,50г)	11	50 (31-66)	31,0 (25,9-36,1)
3 (3,75г)	11	52 (38-65)	29,3 (21,8-35,3)
D (5,00г)	12	55 (37-68)	29,6 (22,6-34,0)
E (6,25г)	11	48 (27-68)	30,2 (27,3-32,7)
Всі групи	56	51 (27-69)	30,1 (21,8-36,1)

Таблиця 24

Етнічна характеристика пацієнтів (N (%))

Лікувальна група	N	Білі (не іспанці і не латиноамериканці)	Білі (іспанці або латиноамериканці)	Чорні	Азіати
A	11	5	5	0	1
B	11	5	6	0	0
3	11	5	5	1	0
D	12	5	7	0	0
E	11	2	9	0	0
Всі групи	56	22(39,3%)	32(57,1%)	1(1,8%)	1(1,8%)

Скринінг значень базової лінії тестостерону

Під час скринінгу всі пацієнти мали концентрації тестостерону <300нг/дл, що підтверджували гіпогонадальний статус всіх пацієнтів перед початком дослідження ліків. Місцева клінічна лабораторія використовувала хемілюмінесцентну методологію для проведення даних досліджень. Середні значення концентрації загального сироваткового тестостерону нульовій лінії скринінгу складають від 215 до 232нг/дл для п'яти окремих груп дозувань. Таблиця 25 представляє середнє значення (діапазон значень) нульової лінії скринінгу за результатами лікувальної групи.

Таблиця 25

Середні значення нульової лінії тестостерону при скринінгу

Лікувальна група	N	Середні значення нульової лінії тестостерону (нг/дл)	Діапазон
A	11	215	73-286
B	11	231	132-293
3	11	230	93-295
D	12	232	132-293
E	11	225	158-282
Всі групи	56	227	23-295

Дані, що характеризують залежність: "концентрація тестостерону-час".

Середні профілі залежності "концентрація-час" досліджуваного тестостерону в день 1-й і день 14-й показані на Фіг.10 і 11, відповідно.

У відповідності з Фіг.10, в день 1-й спостерігається безперервне зростання концентрацій тестостерону в усіх випадках нанесення композиції протягом, приблизно, 8 годин після нанесення дози. Після цього залишок 24-годинного інтервалу дозування концентрації тестостерону залишалися напівгустими. Грунтуючись на середніх профілях залежності "концентрація-час", усі випадки нанесення композиції забезпечували ступінь проникання тестостерону, достатню для підвищення рівнів тестостерону над нижчою межею еугонадального діапазону (>300нг/дл) вже після нанесення одиної дози в день 1-й.

Консистентні рівні тестостерону спостерігалися в більшості 24-годинних профілів залежності "концентрація-час" після множинного дозування 1,62% тестостеронового гелю. Виняток становить нанесення D, 5,00г, при якому через 6 годин після нанесення дози композиції спостерігався значний пік. Таке збільшення в середньому профілі спостерігалось через результати одного пацієнта, який продемонстрував концентрацію тестостерону 4980нг/дл через 6 годин після нанесення дози.

У відповідності з Фіг.11, середні профілі на день 14-й демонструють концентрації тестостерону, які залишаються вищими за нижчу межу еугонадального діапазону (>300нг/дл) протягом 24-годинного інтервалу в дозуванні для всіх п'яти доз. Зростання проникнення тестостерону спостерігалось при збільшенні дози на величину в діапазоні від 1,25г до 6,25г, за винятком другого піку в процедурі D нанесення композиції, 5,00г.

Фармакокінетичні результати тестостерону в таблиці 26 показані фармакокінетичні результати тестостерону для досліджуваного тестостерону і тестостерону, відкоригованого по нульовій лінії, після того, як пацієнти отримали одиначну дозу 1,62% тестостеронового гелю в день 1-й.

Таблиця 26

Фармакокінетичні параметри одиної дози 1,62% тестостеронового гелю в день 1-й

Параметр	Лікувальна група	Доза гелю (г)	Доза тестостерону (мг)	Середнє арифметичне (SD)			
				N	Отримано в результаті спостереження	N	Відкориговано по нульовій лінії
AUC (0-24) (нг*год/дл)	A	1,25	20,3	11	7376 (1465)	11	1934 (1005)
	B	2,50	40,5	11	9112 (3354)	9	3168 (1845)
	C	3,75	60,8	11	8719 (2831)	10	3330 (1875)
	D	5,00	81	12	11933 (3188)	12	5329 (3296)
	E	6,25	101,3	11	11137 (3024)	11	5573 (2602)
C <sub>середн</sub> (нг/дл)	A	1,25	20,3	11	307 (61)	11	81 (42)
	B	2,50	40,5	11	380 (140)	9	132 (77)
	C	3,75	60,8	11	363 (118)	10	139 (78)
	D	5,00	81	12	497 (133)	12	222 (137)
	E	6,25	101,3	11	464 (265)	11	232 (108)
C <sub>макс</sub> (нг/дл)	A	1,25	20,3	11	387 (80)	11	159 (57)
	B	2,50	40,5	11	479 (161)	9	234 (102)
	C	3,75	60,8	11	533 (211)	10	305 (178)
	D	5,00	81	12	698 (231)	12	424 (200)
	E	6,25	101,3	11	657 (215)	11	424 (210)
E <sub>n</sub> [a] (год.)	A	1,25	20,3	11	12 (4-24)	11	12 (4-24)
	B	2,50	40,5	11	12 (4-24)	9	16 (8-24)
	C	3,75	60,8	11	16 (8-24)	10	16 (8-24)
	D	5,00	81	12	12 (2-24)	12	12 (6-24)
	E	6,25	101,3	11	12 (8-24)	11	12 (8-24)

[a] середнє значення (діапазон)

Спостережуване середнє значення C<sub>середн</sub> в день 1-й знаходилося в діапазоні еугонадальних значень 300-1000нг/дл для всіх рівнів дозування. Середні значення AUC і Середи, в основному, зросли в діапазоні дозування до значень дози від 1,25г до 6,25г при таких же значеннях для лікувальних груп B і C та лікувальних груп D і E, відповідно. Середнє C<sub>макс</sub> зростало при дозах від 1,25г до 5,00г, а потім знижувалося. Середнє T<sub>макс</sub> для всіх груп, за винятком 5,00г, складало 12 годин і знаходилося в діапазоні від 2 до 24 годин.

Спостережувані значення C<sub>макс</sub> в день 1-й для 1,25г, 2,50г і 3,75г залишалися нижче за верхню межу еугонадального діапазону (<1000нг/дл). В лікувальній групі D, 5,00г, один пацієнт мав значення C<sub>макс</sub> 1070нг/дл. В лікувальній групі E, 6,25г,

один пацієнт мав значення C<sub>макс</sub> 1020нг/дл. Всі інші значення C<sub>макс</sub> для дня 1-го були <1000нг/дл в лікувальних групах D і E.

Відкориговані по нульовій лінії середні значення параметрів AUC і C<sub>середн</sub> зростали при дозуванні для всіх п'яти рівнів лікування. Відкориговане по нульовій лінії середнє Середи вказує на ендogenous концентрації тестостерону, збільшені від 81 до 232нг/дл при діапазоні дозування від 1,25г до 6,25г після введення одиної дози 1,62% тестостеронового гелю.

Представлені в таблиці 27 фармакокінетичні результати множинної дози для спостережуваного і відкоригованого по нульовій лінії тестостерону нижчі для 1,62% тестостеронового гелю на день 14-й.

Таблиця 27

Фармакокінетичні параметри множинного дозування 1,62% тестостеронового гелю на день 14-й

Параметр	Лікувальна група	Доза гелю (г)	Доза тестостерону (мг)	Середнє арифметичне (SD)			
				N	Отримано в результаті спостереження	N	Відкориговано по нульовій лінії
AUC (0-24) (нг*год/дл)	A	1,25	20,3	11	7731 (2914)	9	3149 (2909)
	B	2,50	40,5	11	9232 (4146)	11	3174 (2628)
	C	3,75	60,8	11	11132 (2950)	11	5346 (3834)
	D	5,00	81	8	16115 (11345)	8	9646 (12002)
	E	6,25	101,3	10	15250 (4123)	10	10005 (4474)
C <sub>середн</sub> (нг/дл)	A	1,25	20,3	11	322 (121)	9	131 (121)
	B	2,50	40,5	11	385 (173)	11	132 (110)
	C	3,75	60,8	11	464 (123)	11	223 (160)
	D	5,00	81	8	671 (473)	8	402 (500)
	E	6,25	101,3	9	634 (182)	9	413 (197)
C <sub>макс</sub> (нг/дл)	A	1,25	20,3	11	464 (158)	9	293 (170)
	B	2,50	40,5	11	506 (195)	11	266 (119)
	C	3,75	60,8	11	750 (221)	11	523 (241)
	D	5,00	81	8	1422 (1450)	8	1145 (1466)
	E	6,25	101,3	10	1179 (520)	10	965 (527)
T <sub>п</sub> [a] (год.)	A	1,25	20,3	11	8 (0-16)	9	4 (0,5-16)
	B	2,50	40,5	11	4 (0-16)	11	8 (0,5-24)
	C	3,75	60,8	11	8(1-12)	11	1 (1-12)
	D	5,00	81	8	1,5 (0,5-24)	8	1,5(0,5-24)
	E	6,25	101,3	10	6 (0,5-24)	10	6 (0,5-24)
C <sub>мін</sub> (нг/дл)	A	1,25	20,3	11	209 (91)	9	46 (77)
	B	2,50	40,5	11	263 (138)	11	29 (70)
	C	3,75	60,8	11	310 (106)	11	89 (152)
	D	5,00	81	8	414 (184)	8	154 (203)
	E	6,25	101,3	10	351 (43)	10	102 (74)
Флуктуація	A	1,25	20,3	11	81 (20)	9	271 (166)
	B	2,50	40,5	11	66 (18)	11	262 (188)
	C	3,75	60,8	11	97 (43)	11	252 (149)
	D	5,00	81	8	129 (66)	8	355 (306)
	E	6,25	101,3	9	117(52)	9	201 (69)

[a] середнє значення (діапазон)

Спостережувані значення параметрів AUC, C<sub>середн</sub> і C<sub>макс</sub> на день 14-й збільшувалися по всьому діапазону дозування від 1,25г до 5,00г, з появою зниження рівня при дозі 6,25 р. В групі з рівнем дозування 5г один пацієнт (#25791) на день 14-й мав значення C<sub>макс</sub> і C<sub>середн</sub>, що дорівнюють 4980нг/дл і 1801нг/дл, відповідно. Вказані значення майже в 4 рази вище, порівняно з іншими пацієнтами в цій же групі. Причина підвищення вказаних рівнів для даного пацієнта невідома. Коли значення, що характеризують даного пацієнта, віддаляються від групового середнього значення, наданого в наведеній вище таблиці, фармакокінетичні параметри для групи з дозою 5,0 г знижуються від 1422 до 914нг/дл для C<sub>макс</sub> і від 67,1 до 510нг/дл для C<sub>середн</sub> відповідно. При використуванні таких відкоригованих середніх значень спостерігається тенденція до збільшення значень C<sub>середн</sub> і C<sub>макс</sub>, порівняно зі всім діапазоном доз від 1,25г до 6,25г.

Спостережувані середні значення C<sub>мін</sub> залишалися вищими за нижчу межу еугонадального

діапазону (>300нг/дл) при множинному дозуванні на рівнях доз 3,75г, 5,00г і 6,25г. Спостерігалися середні значення C<sub>середн</sub> для всіх рівнів доз, рівні від 322 до 671нг/дл, які знаходилися в еугонадальному діапазоні тестостерону від 300 до 1000нг/дл.

Спостережувані значення C<sub>макс</sub> на день 14-й для рівня дози 1,25г залишалися нижче за верхню межу еугонадального діапазону (<1000нг/дл). В інших групах дозувань у всіх 12 пацієнтів спостерігалися значення C<sub>макс</sub> вище 1000нг/дл. При рівні дозування 2,50 один пацієнт мав значення C<sub>макс</sub> 1010нг/дл. При рівні дозування 3,75, один пацієнт мав значення C<sub>макс</sub> 1070нг/дл. При рівні дозування 5,00г чотири пацієнти мали значення C<sub>макс</sub>>1000нг/дл, тобто, в діапазоні від 1050 до 4980нг/дл. При рівні дозування 6,25, шість пацієнтів мали значення C<sub>макс</sub>>1000нг/дл, тобто від 1110 до 2080нг/дл. Дані спостереження ґрунтувалися на біоаналітичних результатах досліджень LC-MS/MS. Дані значення не були визначені під час



клінічного дослідження нешкідливості тестостерона до прийому згаданих вище доз.

Середні значення Середа, відкориговані по нульовій лінії, збільшувалися у міру збільшення значень доз у всьому їх діапазоні. Середні значення  $S_{\text{середн}}$ , відкориговані по нульовій лінії, указують на ендогенні тестостеронові концентрації, збільшені на величину від 131 до 413 нг/дл в діапазоні дозування від 1,25г до 6,25г після 14 днів прийому множинних доз 1,62% тестостеронового гелю.

#### Висновки

Грунтуючись на попередньому аналізі даних про несприятливі наслідки прийому ліків, про нешкідливий тестостерон і на лабораторних вимірюваннях гематокритного числа, а також на оцінці місцевого застосування композиції, можна зробити висновок про те, що 1,62% тестостероновий гель є нешкідливим і добре переноситься пацієнтами при рівнях дозування в діапазоні від 1,25 до 6,25 г гелю (від 20,3 до 101Д мг тестостерону). Після прийому одиної або множинної дози 1,62% тестостеронового гелю при рівнях дозування 1,25г до 6,25г (від 20,3 до 101,1мг тестостерону), досягаються середні значення  $S_{\text{середн}}$  в еугонадальному діапазоні 300-1000нг/дл.

При щонайвищих рівнях дозування 5,00г і 6,25г (81,0 і 101,3мг тестостерону, відповідно) були знайдені більш високі несприятливі для пацієнта значення  $S_{\text{макс}}$ , перевершуючі вищу межу, характерну для нормальних еугонадальних чоловіків. Показаний відповідний моніторинг клінічної картини у фазі 3.

Всі посилальні матеріали, в тому числі публікації, патентні заявки і патенти, згадані в даному документі і включені в даний документ методом посилання в тому об'ємі, неначебто кожний з посилальних матеріалів розглядався індивідуально, і спеціально обмовлявся як такий, який повинен бути включений в даний документ методом посилання і надалі розглядатися в контексті даної заявки в повному об'ємі.

Використовування індивідуальних числових значень встановлюється як наближене, неначебто перед числовими значеннями стояли б слова "біля; примірно" або "приблизно". Аналогічно, числові значення в різних діапазонах, позначених в матеріалах заявки, якщо не обумовлено інше, встановлюються як наближені, неначебто перед мінімальними і максимальними значеннями у встановлених межах діапазону значень стояли б слова "біля; примірно" або "приблизно". Таким чином, варіанти, які перевищують і виходять за межу нижчих встановлених діапазонів могли бути використані для досягнення таких же результатів, що і при значеннях в межах вказаних діапазонів. В контексті даного опису терміни "біля; примірно" і "приблизно" відносно числових значень повинні мати ясний і загальноприйнятий сенс, відомий фахівцю середньої кваліфікації в певній області техніки, до якої даний об'єкт винаходу має найбільш близьке відношення, або в області техніки, релевантної відносно ряду або елемента, представленого в предметі обговорення (у матеріалах заявки). Ступінь-розширення строгих граничних числових значень залежить від багато яких чинни-

ків. Наприклад, деякі дані чинники, є критичними для об'єкту захисту і/або для дії даної кількісної варіації на здійснення заявленого винаходу, а також інші чинники, відомі середньому фахівцю в даному виді техніки і такі, що підлягають обговоренню. В контексті даного опису використання різних кількостей значущих цифр для різних числових значень не означає обмеження в тому, яким чином використання слів "біля; примірно" або "приблизно" буде направлено на розширення окремого числового значення. Так, з урахуванням тлумачення загального поняття, терміни "біля; примірно" або "приблизно" розширюють числове значення. У тому числі, розкриття діапазонів представляє собою безперервний ряд, що включає кожне значення між мінімальним значенням і максимальним значенням плюс розширення ряду (діапазону), що досягається використанням термінів "біля; примірно" або "приблизно". Таким чином, перелік діапазонів (рядів) значень в даному контексті має на меті підкреслити той факт, що кожне окреме значення розглядається як таке, яке підпадає під ознаки, характерні для всього діапазону значень, якщо не обумовлено інше, і кожне окреме значення включено в опис, неначебто воно було названо в описі індивідуально.

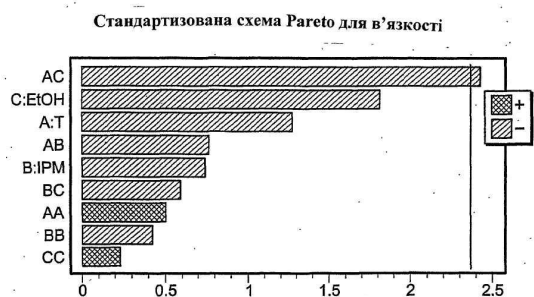
Використовування терміну "винахід" або "даний винахід" жодним чином не обмежує формулу винаходу, при цьому, немає підстав вважати, що будь-який опис або аргумент, асоційований з окремим використанням терміну "винахід" або "даний винахід", застосований до будь-якого і кожного пункту формули. Використовування терміну "винахід" або "даний винахід" здійснено, єдино, для лінгвістичної і граматичної зручності і не обмежує суті жодного з пунктів формули винаходу.

В цьому документі описані альтернативні приклади здійснення заявленого винаходу, що включають кращий відомий винахідникам спосіб здійснення винаходу. Безумовно, після прочитання опису середньому фахівцеві в даній області техніки стануть очевидні і варіанти розкритих прикладів здійснення винаходу. Винахідники, за винятком кваліфікованих фахівців, які просто застосовують такі варіанти як відповідні формулі винаходу, спробують застосувати заявлений винахід інакше, ніж описано в даному документі. Тому, відповідно до діючого закону, заявлений винахід включає всі модифікації і еквіваленти об'єкту винаходу, представленого в пунктах прикладеної формули. При цьому всі комбінації описаних вище елементів у всіх можливих комбінаціях підпадають під об'єм захисту винаходу, якщо інше не вказано або відверто не суперечить суті винаходу.

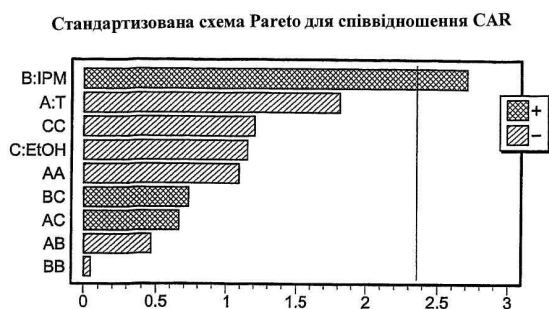
Повинно бути зрозуміло, що будь-які діапазони, співвідношення і діапазони співвідношень, які можуть бути сформовані або отримані від будь-яких даних, розкритих в даному документі, представляють собою додаткові приклади здійснення даного винаходу (розкриття) і включені в документ як складові частини, неначебто вони були чітко відрекомендовані самі. Вказане вище включає існування сформованих діапазонів, які включають або не включають граничні верхні і/або нижні межі. Отже, фахівець середньої кваліфікації в області

техніки, що має найбільш близьке відношення до діапазонів, співвідношень і діапазонів співвідношень, спроможний зробити висновок, що такі значення, однозначно, є похідними від тих даних, які представлені в даному документі.

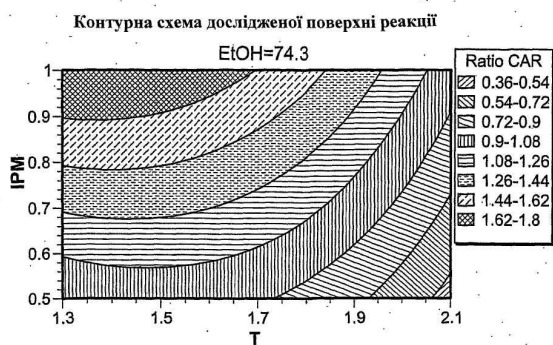
Використовування артиклів "a", "an" і "the" і подібних референтів в контексті даного винаходу (особливо в контексті наступних пунктів формули винаходу) повинне розповсюджуватися як на однину, так і на множину, якщо інше не вказане або ясно не витікає з суті винаходу. Всі способи, описані в даному документі, можуть бути виконані в



Фіг. 1

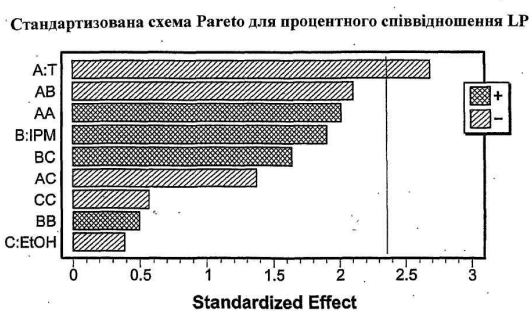


Фіг. 3

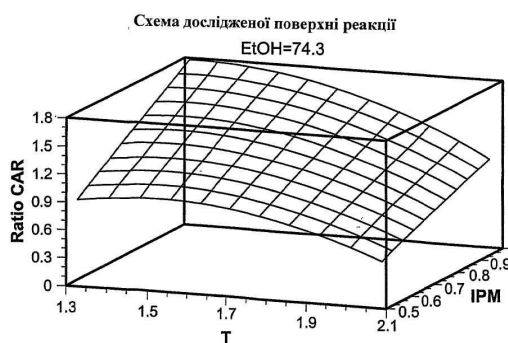


Фіг. 5

будь-якій зручній послідовності, якщо інше вказане або будь-яким чином ясно не витікає з суті винаходу. Використовування одного якого-небудь або всіх прикладів, або спеціальних мовних визначень (таких слів, як "наприклад", "такий, як", "переважний", "переважно") мусить сприйматися як додаткова ілюстрація до змісту винаходу і не обмежує об'єму захисту, що визначений формулою винаходу. Опис винаходу повинен бути складений так, щоб жодна з ознак, не заявлених в пунктах формули, не була представлена в опису як істотна.

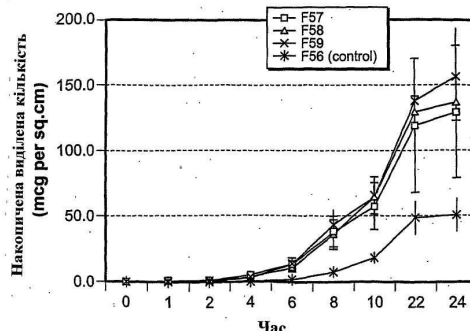


Фіг. 2



Фіг. 4

Проникність контрольних та тестових тестостеронових композицій



Фіг. 6

