



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41376 (13) C2

(51) 7 A61K31/58, A61P17/14

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ТА СПОСІБ ЛІКУВАННЯ АНДРОГЕННОЇ АЛОПЕЦІЇ ІНГІБІТОРАМИ 5- $\alpha$ -РЕДУКТАЗИ

(21) 96041480  
(22) 11.10.1994  
(24) 17.09.2001  
(31) 138.520, 204.905  
(32) 15.10.1993, 17.03.1994  
(33) US, US  
(86) PCT/US94/11507, 11.10.1994  
(46) 17.09.2001, Бюл. № 8, 2001 р.  
(72) Гомлі Гленн Дж., US, Кауфман Кейт Д., US, Стонер Елізабет, US, Вальдштрайхер Джоан, US  
(73) МЕРК ЕНД КО., ІНК., US  
(56) EP, A2, 0285382, A61K31/58, 05.10.1988.  
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., vol. 74, no. 2, 1992, p. 345-350,  
J. STEROID BIOCHEM. MOL. BIOL., vol. 44, no. 2, February 1993, p. 121-131,  
J. STEROID BIOCHEM. MOL. BIOL., vol. 37, no. 3, 1990, p. 375-378,  
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., vol. 79, no. 3, September 1 1994, p. 703-706,  
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., vol. 74, no. 3, 1992  
(57) 1. Фармацевтическая композиция для перорального введения для лечения андрогенной алопеции, включающая ингибитор 5 $\alpha$ -редуктазы в качестве лекарственного препарата в дозе приблизительно 0,05-3,0 мг.  
2. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанным ингибитором является 17 $\beta$ -(N-трет-бутилкарбамоил)-4-аза-5-альфа-андрост-1-ен-3-он.

3. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что доза составляет приблизительно 0,05-1,0 мг.  
4. Фармацевтическая композиция по п. 3, отличающаяся тем, что доза составляет приблизительно 1,0 мг.  
5. Фармацевтическая композиция по п. 4, отличающаяся тем, что андрогенная алопеция представляет собой мужское облысение.  
6. Фармацевтическая композиция по п. 1, в виде твердой композиции, включающей 17 $\beta$ -(N-трет-бутилкарбамоил)-4-аза-5-альфа-андрост-1-ен-3-он в дозе приблизительно 0,05-3,0 мг.  
7. Способ лечения андрогенной алопеции, включающий введение ингибитора 5 $\alpha$ -редуктазы, отличающийся тем, что указанный ингибитор вводят в дозе от 0,05 до 3мг/день.  
8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что ингибитор 5 $\alpha$ -редуктазы представляет собой 17 $\beta$ -(N-трет-бутилкарбамоил)-4-аза-5-альфа-андрост-1-ен-3-он.  
9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что доза составляет 0,05-1,0 мг/день.  
10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что доза составляет 1,0 мг/сутки.  
11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что 17 $\beta$ -(N-трет-бутилкарбамоил)-4-аза-5-альфа-андрост-1-ен-3-он вводят перорально.

Данное изобретение касается лечения андрогенной алопеции, в том числе облысения мужского типа, соединениями, являющимися ингибиторами 5-альфа-редуктазы изофермента 2. Эта работа является частичным продолжением 5.N.08/138520, поданной 15 октября 1993 года.

Некоторые нежелательные физиологические проявления, такие как обыкновенные (юношеские) угри, себорея, гирсутизм (избыточное оволосение у женщин), андрогенная алопеция, включающая в себя как облысение женского так и мужского типа, и доброкачественная гиперплазия предстательной железы, являются результатом гиперандрогенной стимуляции, вызываемой избыточным накоплением тестостерона ("Т") или сходных с ним андро-

генных гормонов (мужских половых гормонов) в метаболической системе. Прежние попытки обеспечить химиотерапевтический агент для противодействия этим нежелательным результатам гиперандрогенности привели к обнаружению нескольких стероидных антиандрогенов, имеющих собственную нежелательную гормональную активность. Например, эстрогены не только нейтрализуют эффект андрогенов, но и имеют также феминизирующее действие. Были разработаны также нестероидные антиандрогены, например, 4'-нитро-3'-трифторметилизобутиранилид. См. Neri, et al., Endocrinol, 1972, 91 (2). Однако, эти продукты, хотя они и лишены гормонального действия, конкурируют со всеми природными андрогенами за ре-

(19) UA (11) 41376 (13) C2

цепторные сайты и, следовательно, имеют тенденцию к феминизации мужчины-реципиента или мужского плода женщины-реципиента и/или инициируют эффекты обратной связи, способные вызывать гиперстимуляцию яичек.

Основным медиатором (посредником) андрогенной активности в некоторых органах-мишенях, например, в предстательной железе (простате), является  $5\alpha$ -дигидротестостерон ("DHT"), локально образующийся в органе-мишени в результате действия тестостерон- $5\alpha$ -редуктазы. Ингибиторы тестостерон- $5\alpha$ -редуктазы могли бы помочь в предотвращении или ослаблении симптомов гиперандрогенной стимуляции в этих органах. См., в частности, UP № 4377584, переуступленный Merck & Co., Inc, опубликованный 22 марта 1983 г. В настоящее время известно, что существует второй изотип  $5\alpha$ -редуктазы, который взаимодействует с кожными тканями, в частности, в волосистой части головы. См., например, G. Harris, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89, pp. 10787-10791 м (Nov. 1992). Этот изотип (изофермент), в основном взаимодействующий с кожными тканями, обычно называют  $5\alpha$ -редуктазой 1 (или типом 1  $5\alpha$ -редуктазы), тогда как изотип, действующий в основном в тканях предстательной железы, называют  $5\alpha$ -редуктазой 2 (или типом 2  $5\alpha$ -редуктазы).

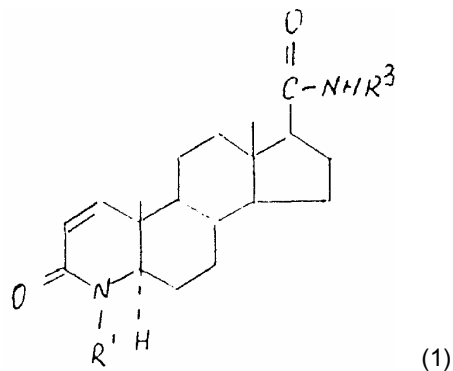
Известно, что финастерид (17 $\beta$ -(N-трет-бутилкарбамоил)-4-аза- $5\alpha$ -андрост-1-ен-3-он), продаваемый Merck & Co., Inc. под товарным знаком PROSCAR® является ингибитором  $5\alpha$ -редуктазы 2, применимым для лечения гиперандрогенных состояний. См, например, US Patent № 4760071. Финастерид продается в настоящее время в Соединенных Штатах и по всему свету для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Применимость финастериды в лечении андрогенной алопеции и рака предстательной железы описана также в следующих документах: EP 0285382, опубликованном 5 октября 1988 г.; EP 0285383, опубликованном 5 октября 1988 г.; Canadian Patent № 1302277; и Canadian Patent №1302276. Характерные дозы, приводимые в качестве примеров в указанных выше описаниях, варьировали от 5 до 2000 мг на больного в день.

В лечении андрогенной алопеции, включающей в себя как облысение женского типа, так и облысение мужского типа, и других гиперандрогенных состояний было бы желательно вводить самую низкую возможную дозу фармацевтического соединения больному, но все еще сохраняющую терапевтическую эффективность. Заявители неожиданно обнаружили, что низкая суточная доза ингибитора  $5\alpha$ -редуктазы 2 особенно применима в лечении андрогенной алопеции. Кроме того, низкую суточную дозу ингибитора  $5\alpha$ -редуктазы 2 можно также применять, в частности, в лечении гиперандрогенных состояний, таких как обыкновенные (юношеские) угри, себорея, гирсутизм у женщин и синдром поликистозного яичника.

Данное изобретение включает в себя способ лечения и/или возвращения к прежнему состоянию андрогенной алопеции и усиления роста волос и способы лечения обыкновенных

угрей, себореи и гирсутизма (избыточного оволосения у женщин), которые предусматривают введение больному, нуждающемуся в таком лечении, ингибитора  $5\alpha$ -редуктазы 2 в дозе менее 5 мг/сутки. В одном варианте этого изобретения ингибитор  $5\alpha$ -редуктазы 2 вводят в дозе от 0,01 до 3,0 мг/сутки. В одном классе этого варианта осуществления ингибитор  $5\alpha$ -редуктазы 2 вводят в количестве от 0,05 до 1,0 мг/сутки, а в подклассе этого варианта ингибитор  $5\alpha$ -редуктазы 2 вводят в количествах приблизительно 0,05-0,2 мг/сутки. Иллюстрацией этого подкласса являются дозы приблизительно 0,05, 0,1, 0,15 и 0,2 мг/сутки. Примерами этого подкласса являются дозы 0,05 и 0,2 мг/сутки. Соединения, являющиеся ингибиторами  $5\alpha$ -редуктазы 2, могут быть определены с применением теста, описанного ниже в примере 3.

Во втором варианте этого изобретения способ лечения андрогенной алопеции предусматривает введение ингибиторных соединений  $5\alpha$ -редуктазы 2, имеющих структурную формулу (1)



или их фармацевтически приемлемой соли:

$R^1$  обозначает водород, метил или этил;

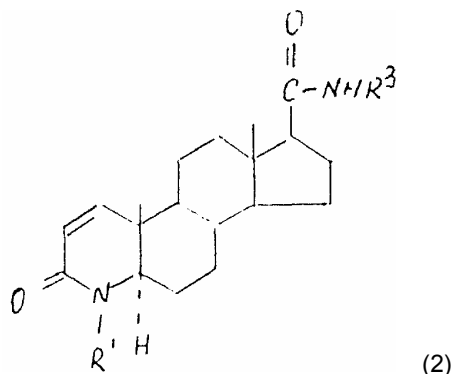
$R^2$  обозначает углеводородный радикал, выбранный из алкила с прямой или разветвленной цепью из 1-12 атомов углерода или моноциклического арила, необязательно содержащего 1 или более заместителей из нижнего алкила, содержащего 1-2 атомов углерода и/или 1 или более галогенов (Cl, F или Br);

$R'$  обозначает водород или метил;

$R''$  обозначает водород или  $\beta$ -метил; и

$R'''$  обозначает водород,  $\alpha$ -метил или  $\beta$ -метил.

В одном классе этого второго варианта воплощения соединения ингибитора  $5\alpha$ -редуктазы 2 имеют структурную формулу (2)



или фармацевтически приемлемой соли такого соединения, где

R<sup>1</sup> обозначает водород или метил; и

R<sup>3</sup> обозначает алкил с разветвленной цепью из 4-8 атомов углерода.

Типичные соединения, которые могут быть использованы в данном изобретении, включают в себя:

17β-(N-трет-бутилкарбамоил)-4-аза-5-α-андрост-1-ен-3-он,

17β-(N-изобутилкарбамоил)-4-аза-5-α-андрост-1-ен-3-он,

17β-(N-трет-октилкарбамоил)-4-аза-5-α-андрост-1-ен-3-он,

17β-(N-октилкарбамоил)-4-аза-5-α-андрост-1-ен-3-он,

17β-(N-1.1-диэтилбутилкарбамоил)-4-аза-5-α-андрост-1-ен-3-он,

17β-(N-неопентилкарбамоил)-4-аза-5-α-андрост-1-ен-3-он,

17β-(N-трет-амилкарбамоил)-4-аза-5-α-андрост-1-ен-3-он, и

17β-(N-трет-гексилкарбамоил)-4-аза-5-α-андрост-1-ен-3-он;

и соответствующие соединения, в которых 4-азот замещен радикалами метилом или этилом в каждом из указанных выше соединений.

Типичными соединениями являются также любые из указанных выше соединений, имеющие в качестве заместителя азота, алкил с разветвленной цепью, замещенный метилом, этилом, пропилом, изопропилом, бутилом, фенилом; 2, 3 или 4-толилом, ксилилом, 2-бром- или 2-хлорфенилом, 2,6-дихлор- или 2,6-дибромфенилом.

Соединения формулы I и II, описанные выше, можно синтезировать согласно способам, хорошо известным в этой области, описанным, например, в US № 4760071, EP 0285382 и EP 0285383. Соединение финастерид доступно в настоящее время в качестве предписываемого согласно рецептам фармацевтического препарата из Merck & Co., Inc. Синтез финастерида описан в US № 4760071. Еще один синтез финастерида описан в Synthetic Communications 30 (17), p. 2683-2690 (1990).

Целью данного изобретения является обеспечение способов лечения гиперандрогенных состояний, в том числе облысения мужского типа и облысения женского типа, обыкновенных (юношеских) угрей, себореи, гирсутизма (избыточного оволосения) у женщин и синдрома поликистозного яичника, посредством системного, перорального, парентерального или местного введения ингибитора 5α-редуктазы 2 в дозе менее 5 мг/сутки и конкретно приблизительно от 0,01 мг/сутки до 3,0 мг/сутки, более конкретно 0,05-0,2 мг/сутки. Далее изобретение иллюстрируется дозами приблизительно 0,05-0,2 мг/сутки и специфически дозами приблизительно 0,05, 0,1, 0,15 и 0,2 мг/сутки. В примерах изобретения приведены дозы 0,05 и 0,2 мг/сутки. Термин "лечение андрогенной алопеции" включает в себя остановку андрогенной алопеции и/или возвращение к прежнему состоянию (до облысения) и усиление роста волос. Ингибитор 5α-редуктазы 2, например, финастерид, при дозе ме-

нее 5мг/сутки можно использовать в комбинации с веществом, открывающим калиевые каналы, таким как миноксидил или его фармацевтически приемлемая соль, для лечения андрогенной алопеции, в том числе облысения мужского типа. Ингибитор 5α-редуктазы 2 и "открыватель" калиевых каналов можно применять топически (местно) или каждое средство можно вводить различными путями введения; например, ингибитор 5α-редуктазы 2 можно вводить перорально, тогда как "открыватель" калиевых каналов можно вводить топическим способом.

Целью данного изобретения является также создание подходящих системных, пероральных, парентеральных и топических фармацевтических готовых форм для применения в новых способах лечения, описываемых в данном изобретении. Композиции, содержащие соединения, являющиеся ингибиторами 5α-редуктазы 2, в качестве активного ингредиента, для применения в лечении указанных выше гиперандрогенных состояний могут вводиться в виде большого разнообразия терапевтических лекарственных форм в общепринятых носителях для системного (относящегося ко всему организму) введения. Например, эти соединения можно вводить в виде таких пероральных лекарственных форм, как таблетки, капсулы (каждая из этих форм может быть формой с пролонгированным действием), драже, порошки, гранулы, эликсиры, настойки, растворы, суспензии, сиропы и эмульсии. Они могут также вводиться в форме для внутривенного (как инъекцией, так и инфузией), внутривентриального, подкожного, местного (с повязкой или без нее) или внутримышечного введения, причем эти формы применения хорошо известны специалистам с обычной квалификацией в области фармации. Для перорального введения, например, эти композиции могут быть обеспечены в форме таблеток с насечками или без содержащих 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 1,0, 2,0 и 3,0 г активного ингредиента для симптоматического подбора дозы для подвергающегося лечению больного.

Для лечения андрогенной алопеции, в том числе облысения мужского типа, обыкновенных угрей, себореи и гирсутизма у женщин, соединения ингибитора 5α-редуктазы 2 можно вводить в виде фармацевтической композиции, содержащей активное соединение в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, приспособленным для топического введения. Топические фармацевтические композиции могут быть, например, в форме раствора, крема, мази, геля, лосьона, шампуня или аэрозольной формы, пригодных для нанесения на кожу. Топические фармацевтические композиции, применимые в способе лечения данного изобретения, могут включать в себя приблизительно 0,001-0,1% активного соединения в смеси с фармацевтически приемлемым носителем.

Предпочтительно можно вводить соединения данного изобретения в единичной суточной дозе или общая суточная доза может быть введена в виде разделенной общей дозы два, три или четыре раза в сутки. Соединения данного изобретения можно вводить интраназально посредством топического использования подходящих для этого интраназальных носителей или чрезкожно с приме-

нением хорошо известных специалистам с обычной квалификацией в этой области трансдермальных кожных пластырей. Для введения в форме чрезкожной системы доставки введение дозы должно быть скорее непрерывным, чем прерывистым, в схеме приема лекарственного средства. Соединения данного изобретения могут также доставляться в виде суппозитория с применением такой основы, как масло-какао, глицеринированный желатин, гидрогенизированные растительные масла, смеси полиэтиленгликолей разной мол. массы и эфиров жирных кислот полиэтиленгликоля.

Схема лечения с применением соединений данного изобретения выбирается в соответствии со множеством факторов, включающих в себя тип, вид, возраст, вес, пол и медицинское состояние больного; тяжесть состояния, которое должно быть подвергнуто лечению; способ введения; работу почек и печени больного; и конкретное применяемое соединение данного изобретения. Лечащий врач или ветеринар с обычной квалификацией может легко определить и прописать эффективное количество лекарственного средства, необходимого для предотвращения, противодействия, остановки или обращения прогрессирования данного состояния. Оптимальная точность в достижении концентрации лекарственного средства в диапазоне, который дает эффективность лечения без токсичности, требует режима лечения, основанного на динамике доступности лекарственного средства для сайтов-мишеней. Это предусматривает принятие во внимание распределения, равновесия и выведения лекарственного средства.

В способах данного изобретения соединения, ингибирующие  $5\alpha$ -редуктазу 2, описанные здесь детально, могут образовать активный ингредиент и в типичном случае вводятся в смеси с подходящими фармацевтическими разбавителями, наполнителями или носителями (в целом называемыми здесь материалами "носителя"), выбираемыми в соответствии с предполагаемой формой введения, т.е. пероральными таблетками, капсулами, эликсирами, сиропами и т.п., и согласующимися с традиционной фармацевтической практикой.

Например, для перорального введения в форме таблетки или капсулы активный лекарственный компонент может быть соединен с пероральным фармацевтически приемлемым инертным носителем, таким как этанол, глицерин, вода и т.п. Капсулы, содержащие продукт этого изобретения, можно приготовить смешиванием активного соединения данного изобретения с лактозой и стеаратом магния, стеаратом кальция, крахмалом, тальком или другими носителями и помещением этой смеси в желатиновую капсулу. Таблетки можно приготовить смешиванием активного ингредиента с общепринятыми таблетирующими ингредиентами, такими как фосфат кальция, лактоза, кукурузный крахмал или стеарат магния. Кроме того, если желательно или необходимо, в эту смесь могут быть также включены подходящие связующие вещества, смазывающие вещества, разрушающие агенты и красители. Подходящие связующие вещества включают в себя крахмал, желатин, природные сахара, такие как глюкоза или  $\beta$ -лактоза, сахаристые вещества из кукурузы,

природные и синтетические камеди, такие как Асасия (аравийская камедь) трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлоза, полиэтиленгликоль, воска и т.п. Смазывающие вещества, применяемые в этих лекарственных формах, включают в себя олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и т.п. Дезинтеграторы (способствующие распадемости лекарственной формы) включают в себя, без ограничений, крахмал, метилцеллюлозу, агар, бентонит, ксантановую камедь и т.п.

Жидкие формы готовят в ароматизированных подходящим образом суспендирующих или диспергирующих агентах, таких как синтетические и природные камеди, например, трагакант, Асасия (аравийская камедь), метилцеллюлоза и т.п. Другие диспергирующие агенты, которые могут быть применены, включают глицерин и т.п. Для парентерального введения желательны стерильные суспензии и растворы. Желательны изотонические препараты, содержащие обычно подходящие консерванты, для применения во внутривенном введении.

Топические препараты, содержащие компонент активного лекарственного средства, можно смешивать с большим разнообразием материалов-носителей, хорошо известных в этой области, таких как, например, спирты, гель Aloe vera аллантоин, глицерин, витамины А и Е, содержащие масла, минеральное масло, пропиленгликоль, РСС2 миристилпропионат и т.п., с образованием, например, спиртовых растворов, топических очищающих средств, гелей для кожи, очищающих кремов, лосьонов для кожи и шампуней в виде кремов или гелей. См., например, EP 0285382.

Соединения данного изобретения можно также вводить в форме липосомных систем доставки, таких как маленькие однослойные пузырьки, большие однослойные пузырьки и многослойные пузырьки. Липосомы могут быть образованы из множества фосфолипидов, таких как холестерин, стеариламин или фосфатидилхолины.

Соединения данного изобретения могут также доставляться с применением моноклональных антител в качестве индивидуальных носителей, с которыми соединены молекулы соединения данного изобретения. Соединения данного изобретения могут быть также соединены с растворимыми полимерами в качестве нацеленных носителей лекарственного средства. Такие полимеры могут включать в себя поливинилпирролидон, сополимер пирана, полигидроксипропилметакриламид-фенол, полигидроксиэтиласпартамид-фенол или полиэтиленоксидполилизин, замещенный остатками пальмитоила. Кроме того, соединения данного изобретения могут быть соединены с классом биоразлагаемых полимеров, используемых в достижении контролируемого высвобождения лекарственного средства, например, полимолочной кислотой, полиэпсилонкапролактоном, полигидроксимасляной кислотой, полиортоэфирными, полиацетальными, полидигидропиранами, полицианоакрилатами и сшитыми или амфипатическими блок-сополимерами гидрогелей.

Следующие примеры иллюстрируют данное изобретение и не должны рассматриваться как ог-

раничивающие это изобретение, изложенное в формуле изобретения.

#### Пример 1

Известно, что финастерид встречается в двух различных полиморфных кристаллических формах, называемых "форма 1" и "Форма 11". Форма 1 продается в виде 5 мг-ых таблеток (PROSCAR®).

Форма 1 финастерида может быть приготовлена растворением финастерида в ледяной уксусной кислоте (приблизительно 100 мг/мл) и добавлением при перемешивании воды до тех пор, пока масс.% воды не будет равен (или более) 84%. Полученную твердую фазу собирают фильтрованием и сушат в вакууме при приблизительно 50°C. Полученная Форма 1 характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), при скорости нагревания 20°C/мин. в закрытой чашке (бюксе), обнаруживающей малую эндотерму с пиком температуры приблизительно 232°C, экстраполированной начальной температурой приблизительно 223°C, с теплотой ассоциации приблизительно 11 джоулей/г и большую эндотерму плавления с максимальной температурой приблизительно 261°C, экстраполированной начальной температурой приблизительно 258°C, с теплотой ассоциации приблизительно 89 джоулей/г. Рентгенограмма порошка характеризуется  $\alpha$ -интервалами 6,44, 5,69, 5,36, 4,89, 4,55, 4,31, 3,85, 3,59 и 3,14. FT-инфракрасный спектр обнаруживает полосы при 3431, 3237, 1692, 1666, 1602 и 688  $\text{см}^{-1}$ . Растворимости в воде и циклогексане при 25°C равны 0,05±0,02 и 0,27±0,05 мг/г, соответственно. Кроме того, Форму 1 финастерида можно получить перекристаллизацией из сухого ( $\text{H}_2\text{O}$  < 1 мг/мл) этилацетата и изопропилацетата. Выделенные твердые вещества сушат в вакууме при приблизительно 50°C. Они имеют те же самые физические характеристики, которые представлены выше.

#### Пример 2

Форма 11 финастерида может быть получена растворением финастерида в ледяной уксусной кислоте (приблизительно 100 мг/мл) и добавлением воды при перемешивании до тех пор, пока масс.% воды не будет равен (или более) приблизительно 75 %, но не будет превышать 80%. Полученную твердую фазу собирают фильтрованием и сушат в вакууме при приблизительно 100°C. Полученная Форма 11 характеризуется кривой DSC, при скорости нагревания 20°C/мин. в закрытом бюксе, обнаруживающей единственную эндотерму плавления с пиком температуры приблизительно 261°C, экстраполированной начальной температурой приблизительно 258°C, с теплотой ассоциации приблизительно 89 джоулей/г. Рентгенограмма порошка характеризуется  $\alpha$ -интервалами 14,09, 19,36, 7,92, 7,18, 6,40, 5,93, 5,66, 5,31, 4,68, 3,90, 3,60 и 3,25. FT-инфракрасный спектр обнаруживает полосы при 3441, 3215, 1678, 1654, 1597, 1476 и 752  $\text{см}^{-1}$ . Растворимости в воде и циклогексане при 25°C равны 0,16±0,02 и 0,42±0,05 мг/г, соответственно. Кроме того, форму 11 финастерида можно получить перекристаллизацией из этилацетата, содержащего 2-30 мг/мл воды, и из изопропилацетата, содержащего 2-15 мг/мл воды. Выделенные твердые вещества су-

шат в вакууме при приблизительно 80°C. Они имеют те же самые физические характеристики, которые даны выше. Форму 11 можно также получить нагреванием Формы 1 приблизительно до 150°C, выдерживанием при этой температуре примерно в течение часа и охлаждением вновь до комнатной температуры. Форма 11, полученная таким образом, имеет те же физические характеристики, которые даны выше.

#### Пример 3

Получение 5 $\alpha$ -редуктазы предстательной железы человека

Пробы ткани человека измельчали с применением охлаждающей мельницы и гомогенизировали в 40 мМ, фосфате калия, pH 6,5, 5 мМ сульфата магния, 25 мМ хлориде калия, 1 мМ фенолметилсульфонилфториде, 1 мМ дитиотреитоле (DTT), содержащем 0,25 М сахарозы, при помощи гомогенизатора Potter-Elvehilm. Неочищенный ядерный осадок получали центрифугированием этого гомогената при 1500 об/мин в течение 15 минут. Неочищенный ядерный осадок промывали два раза и ресуспендировали в двух объемах буфера. К ресуспендированному осадку добавляли глицерин до конечной концентрации 20%. Эту суспензию фермента замораживали в аликвотах при -80°C. Редуктазы предстательной железы были стабильны в течение по меньшей мере 4 месяцев при хранении в этих условиях.

#### Определение 5 $\alpha$ -редуктазы (тест)

Реакционная смесь для типа 2 5 $\alpha$ -редуктазы содержала 40 мМ цитрата натрия, pH 5,5, 0,3 мкМ [7- $^3\text{H}$ ]-тестостерона, 1 мМ дитиотреитола и 500 мкМ НАДФН в конечном объеме 100 мкл. В типичном случае тест инициировали добавлением 50-100 мкг гомогената простаты и инкубировали при 37°C. После 10-15 минут реакцию останавливали экстракцией 250 мкл смеси 70% циклогексана: 30% этилацетата, содержащей по 10 мкг ДНТ и Т. Водный и органический слой разделяли центрифугированием при 14000 об/мин в микрофуге Эппендорфа. Органический слой подвергали ЖХВР (HPLC) в нормальной фазе (10 см колонка Whatman portasil 5 silica, уравновешенная в 1 мл/мин, смеси 70% циклогексан: 30% этилацетат; время удерживания: ДНТ, 6,8-7,2 мин; андростандиол, 7,6-8,0; Т, 9,1-9,7 мин). Система HPLC (ЖХВР) состояла из градиентной системы Waters Model 680, снабженной приспособлением для отбора проб Hitachi Model 655A, переменным УФ-детектором Applied Biosystems Model 757 и анализатором радиоактивности Radiomatic Model A120. Превращение Т в ДНТ наблюдали при помощи проточного детектора радиоактивности путем смешивания эфлюента HPLC с одним объемом Flo Seint 1 (Radiomatic). При описанных условиях образование ДНТ было линейным в течение по меньшей мере 25 минут. Единственными стероидами, наблюдаемыми в случае препаратов простаты человека, были Т, ДНТ и андростандиол.

#### Исследования по ингибированию

Соединения растворяли в 100% этаноле. Величины  $1\text{C}_{50}$  представляют собой концентрацию ингибитора, требующуюся для снижения активности фермента до 50% от контроля. Величины  $1\text{C}_{50}$  определяли с применением 6-точечного титрова-

ния, при котором концентрация ингибитора варьировала от 0,1 до 1000 нМ.

#### Пример 4

Способ макрофотографии и фотографии общего вида для детектирования роста волос

А. Способ макрофотографии

Местоположение: идентификационная карта (ID карта).

Зона-мишень счета волос.

Оборудование: пленка Kodak-T-max 24 exposure (каждая с одним и тем же серийным номером эмульсии).

Камера: Nikon N-6000.

Объектив: Nikkor 60 mmf 2,8.

Вспышки: Nikon SB-21B Macroflash.

Устройство: регистрирующее устройство.

Процедура фотографии:

В этих клинических фотографиях единственной допускаемой переменной является число волос. Эмульсия пленки, освещение, обрамление, экспозиция и соотношения репродукции с действительным размером (коэффициенты репродукции) были постоянными.

1. Зону подсчета волос на больном готовили следующим образом: татуировку из небольших (~1 мм) точек наносили в начале исследования на ведущем крае зоны облысения непосредственно впереди центра лысого пятна темени с применением коммерческой татуировочной машины или вручную (иглой с чернилами). Зону размером примерно 1 кв. дюйм с центром при татуировке на ведущем крае зоны облысения коротко подстригали (~2 мм). Срезанные волосы удаляли из этой зоны для фотографии при помощи липкого пластыря. Сжатый воздух и/или вытирание этанолом можно также использовать для облегчения удаления срезанных волос.

2. Увеличение: Каждый объектив имел фиксированный коэффициент репродукции 1:1,2.

Диафрагма: Каждую фотографию получали при f/22.

Пленка: T-Max 100 (экспозиция 24).

3. Зона-мишень счета волос больного. Три экспозиции (-2/3, 0 и +2/3 f-stop).

Подготовленный техник (лаборант) помещает прозрачный лист на отпечатанную фотографию и при помощи ручки с войлочным кончиком представляет черную точку над каждым видимым волосом. Прозрачную карту точек затем считают при помощи анализа изображения с применением компьютера.

Фотографии кодируют произвольным номером, соответствующим месту исследования, номеру визита больного и номеру локализации больного для гарантии сохранения. На 6-ом меся-

це считали базовую линию и фотографии 6-го месяца и данные анализировали для промежуточного анализа. На 12-ом месяце считали базовую линию, фотографии 6-го и 12-го месяца и данные анализировали для первичной конечной точки.

Методология детектирования роста волос также описана в Olser, E. A. и Delong, E., J. American Academy of Dermatology, Vol 23, p. 470 (1990).

В. Способ фотографии общего вида

Местоположение: Цветная карта/1D карта больного.

Фотография общего вида.

Оборудование: пленка Kodachrome RR-64 24 exposure, каждая с одним и тем же серийным номером эмульсии.

Камера: Nikon N-6000.

Объектив: Nikkor 60 mmf 2,8.

Вспышки: Nikon S B-23.

Процедура фотографии:

В этих клинических фотографиях единственной допускаемой переменной является вид всей зоны облысения. Что-либо внешнее по отношению к этой зоне (одежда, мебель, стены и т.д.) исключаются из фотографируемого поля зрения.

1. Больные должны иметь фотографии общего вида, сделанные перед стрижкой волос, с головой в фиксированном положении, определяемом применением стереотактического устройства. Волосы на голове больного укладывают таким образом, чтобы они не затемняли зоны облысения.

2. Увеличение: каждый объектив имеет фиксированный коэффициент репродукции 1:6.

Диафрагма: каждую фотографию получают при f/11.

Пленка: применяют Kodachrome (24 exposure).

3. Фотографии общего вида больного. Три экспозиции при нулевой компенсации.

С применением описанной выше методики можно показать, что введение ингибиторов 5 $\alpha$ -редуктазы 2, включающих финастерид, в дозах менее 5 мг/сутки на больного, например, 1мг/сутки или 0,2 мг/сутки, применимо в лечении андрогенной алопеции и усиливает рост волос у больных с таким состоянием.

#### Пример 5

В другом тесте финастерид вводили перорально в течение 6 недель мужчинам с мужским типом облысения при дозах 0,2 мг/сутки, 1,0 мг/сутки и 5,0 мг/сутки. Результаты этого теста показали значительное уменьшение содержания ДНТ в ткани волосистой части головы обследуемых участников.

---

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)  
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26  
(044) 295-81-42, 295-61-97

---

Підписано до друку \_\_\_\_\_ 2002 р. Формат 60x84 1/8.  
Обсяг \_\_\_\_\_ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. \_\_\_\_\_

---

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.  
(044) 268-25-22

---