

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 3 360 575

a nome: Besins Healthcare Luxembourg SARL

a: 2668 Luxembourg - LUSSEMBURGO

dal titolo: Composizioni farmaceutiche transdermiche  
comprendenti agenti attivi.

#### DESCRIZIONE

##### **CAMPO DELL' INVENZIONE**

La presente invenzione si riferisce a composizioni per trasportare un agente terapeuticamente attivo attraverso la pelle di un soggetto, ad esempio, a composizioni farmaceutiche transdermiche, nonché a dette composizioni per l'uso in un metodo terapeutico.

##### **PRECEDENTE**

È ben noto che certi agenti terapeuticamente attivi non sono adatti alla somministrazione orale per varie ragioni associate, tra l'altro, o con un alto livello di metabolismo nel fegato ("effetto di primo passaggio") o con un alto livello di degradazione gastrointestinale. Le formulazioni transdermiche o transmucosali sono state sviluppate al fine di aggirare questi inconvenienti. Nello specifico, le composizioni farmaceutiche per la somministrazione transdermica o transmucosale hanno diversi vantaggi

rispetto alle forme orali, inclusa l'eliminazione dei problemi associati al metabolismo dell'agente terapeuticamente attivo da parte del fegato e alla degradazione gastrica dell'agente attivo.

WO2004/091631 A1 descrive metodi e composizioni transdermiche per il trattamento della depressione mediante somministrazione transdermica di composizioni topiche comprendenti uno steroide nella via sintetica del testosterone. Tuttavia, le composizioni transdermiche e transmucosali affrontano problemi associati alla cinetica del passaggio degli agenti terapeuticamente attivi dalla superficie della pelle nel flusso sanguigno. In effetti, la pelle è un tessuto eterogeneo che comprende due strati: il derma e lo strato più esterno dell'epidermide, che può essere ulteriormente diviso in strato corneo ed epidermide vitale. Questi strati forniscono alla pelle capacità di barriera contro l'entrata di sostanze estranee come i farmaci. Lo strato corneo agisce come barriera diffusiva fisica, mentre epidermide e derma possono fornire in aggiunta una barriera biochimica o enzimatica. Gli studi riguardanti l'assorbimento di agenti terapeuticamente attivi da parte della pelle si sono concentrati in gran parte sul miglioramento della velocità di assorbimento degli ingredienti di agenti

attivi attraverso la pelle, piuttosto che prestare attenzione alla sorte degli agenti attivi assorbiti. Per esempio, è stato proposto l'uso di potenziatori della permeazione al fine di aumentare la velocità iniziale degli agenti attivi penetrati attraverso la pelle. Il termine "potenziatore della permeazione" generalmente si riferisce a qualsiasi molecola che promuove la diffusione reversibile di un agente attivo attraverso la pelle o le membrane mucose, e qualsiasi agente solubilizzante che promuove la suddivisione dell'agente attivo tra il veicolo e lo strato corneo dell'epidermide o delle membrane mucose. La maggior parte dei potenziatori influenza le capacità di barriera dello strato corneo, vale a dire, essi alterano in modo reversibile la struttura dello strato corneo, aumentando in questo modo la diffusività e solubilità del farmaco. Ciò di fatto potenzia la penetrazione cutanea degli agenti attivi, ma può anche determinare l'assorbimento diretto di una grande quantità del farmaco attraverso i tessuti, che porta a un picco di concentrazione di agente attivo nel sangue nelle ore immediatamente successive all'applicazione della composizione. Questo picco iniziale è spesso seguito da un abbassamento delle concentrazioni di sangue prima dell'applicazione

successiva della composizione, che generalmente avviene molte ore dopo, o una volta al giorno. Un aumento così improvviso della concentrazione del farmaco nel sangue può essere pericoloso per il paziente in quanto si può superare la dose del farmaco tollerata dall'organismo. In aggiunta, dato che l'intera dose di agente attivo viene trasportata nel flusso sanguigno e nei tessuti nelle prime ore successive all'applicazione, gli effetti previsti del farmaco possono non durare fino all'applicazione successiva. Rimane la necessità, pertanto, di composizioni farmaceutiche transdermiche in grado di trasportare almeno parte del loro contenuto attivo in una modalità a rilascio controllato, per esempio attraverso la conservazione temporanea nel derma.

#### **SOMMARIO**

Nella presente sono descritte composizioni farmaceutiche transdermiche a rilascio prolungato, e metodi di realizzazione e uso delle stesse. L'invenzione è definita dalle rivendicazioni allegate. Qualsiasi forma di realizzazione o divulgazione descritta nella presente che non rientra nell'ambito delle rivendicazioni è a solo titolo illustrativo. Secondo un primo aspetto dell'invenzione, sono fornite composizioni farmaceutiche a rilascio prolungato per

la somministrazione topica su una superficie cutanea comprendenti: un agente farmaceuticamente attivo comprendente uno o più steroidi, dallo 0,01% al 5% in peso del peso totale della composizione farmaceutica di un estere di acido grasso, acqua, un monoalcol C2-C6, un acido grasso, e dallo 0,05% al 5% in peso di un agente gelificante, in cui il rapporto peso : peso dell'estere di acido grasso nella composizione rispetto all'agente attivo complessivo in detta composizione è almeno 4:1 estere di acido grasso : agente attivo, preferibilmente nell'intervallo da 4:1 a 20:1. In alcune forme di realizzazione, la composizione comprende inoltre un co-solvente, quale propilene glicole. In alcune forme di realizzazione, il co-solvente è presente in una quantità nell'intervallo dallo 0,01% al 7% in peso del peso totale della composizione farmaceutica, o in una quantità nell'intervallo dal 3% al 7% in peso del peso totale della composizione farmaceutica. In alcune forme di realizzazione, l'estere di acido grasso è selezionato dal gruppo costituito da etil oleato, isopropil oleato, isopropil miristato, isopropil isostearato, isopropil palmitato, etil ottanoato, etil dodecanoato, etil linoleato, etil palmitoleato, etil isostearato ed etil linolenato. In alcune forme di

realizzazione, l'estere di acido grasso è l'estere che risulta dalla reazione dell'acido grasso formulato nella composizione con un alcol. In altre forme di realizzazione, l'estere di acido grasso non è l'estere che risulta dalla reazione dell'acido grasso formulato nella composizione con l'alcol formulato nella composizione. L'estere di acido grasso è presente in una quantità nell'intervallo dallo 0,01% al 5% in peso del peso totale della composizione farmaceutica, o in una quantità nell'intervallo dallo 0,05% al 2,4% in peso del peso totale della composizione farmaceutica, o in una quantità nell'intervallo dallo 0,1% al 2,2% in peso del peso totale della composizione farmaceutica. In alcune forme di realizzazione, l'acido grasso è un acido grasso C8-C22. In alcune forme di realizzazione, l'acido grasso è selezionato dal gruppo costituito da acido caprico, acido laurico, acido miristico, acido palmitico, acido stearico, acido oleico, acido isostearico, acido palmitoleico, acido linoleico e acido linolenico. In una forma di realizzazione preferita, l'acido grasso è acido oleico. In alcune forme di realizzazione, l'acido grasso è presente in una quantità nell'intervallo dal 0,01% al 5% in peso del peso totale della composizione farmaceutica, o in una quantità nell'intervallo dal

0,05% all'3,5% in peso del peso totale della composizione farmaceutica, o in una quantità nell'intervallo dal 1,0% al 3,0% in peso del peso totale della composizione farmaceutica. In alcune forme di realizzazione, le composizioni comprendono il 2% di etil oleato come estere di acido grasso, il 2% di acido oleico come acido grasso e il 5% di propilene glicole come co-solvente, tutti in peso rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. In altre forme di realizzazione specifiche, le composizioni comprendono lo 0,3% di etil oleato come estere di acido grasso, lo 0,3% di acido oleico come acido grasso e lo 0,75% di propilene glicole come co-solvente, tutti in peso rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. In alcune forme di realizzazione, l'agente farmaceuticamente attivo è selezionato dal gruppo costituito da estrogeni, androgeni, anti-androgeni, progestinici e relative miscele. In alcune forme di realizzazione, l'agente farmaceuticamente attivo è selezionato tra estradiolo e progesterone, e l'estere di acido grasso è etil oleato. In altre forme di realizzazione specifiche, l'agente farmaceuticamente attivo è selezionato tra testosterone e diidrotestosterone (DHT), e l'estere di acido grasso è selezionato tra etil oleato e isopropil

miristato. In alcune forme di realizzazione, l'agente attivo è presente in una quantità di almeno lo 0,01% in peso del peso totale della composizione farmaceutica. In alcune forme di realizzazione, l'alcol è selezionato dal gruppo costituito da etanolo, n-propanolo, isopropanolo, n-butanolo, isobutanolo, terz-butanolo, e relative miscele. In una forma di realizzazione preferita, l'alcol è etanolo. In alcune forme di realizzazione, l'alcol è presente in una quantità nell'intervallo dal 10% al 90% in peso del peso totale della composizione farmaceutica, o in una quantità nell'intervallo dal 20% all'80% in peso del peso totale della composizione farmaceutica, o in una quantità nell'intervallo dal 45% al 75% in peso del peso totale della composizione farmaceutica. Metodi per realizzare una composizione farmaceutica a rilascio prolungato per la somministrazione topica su una superficie cutanea comprendono miscelare un agente farmaceuticamente attivo comprendente uno o più steroidi, un estere di acido grasso, acqua, un monoalcol C2-C6 e un acido grasso, in cui il rapporto peso : peso dell'estere di acido grasso nella composizione rispetto all'agente attivo complessivo in detta composizione è almeno 4:1 estere di acido grasso : agente attivo, preferibilmente nell'intervallo da

circa 4:1 a circa 20:1. Qualsiasi composizione come descritta in precedenza e di seguito può essere realizzata mediante tali metodi. In un secondo aspetto dell'invenzione vengono fornite composizioni secondo il primo aspetto dell'invenzione per l'uso in un metodo terapeutico di trattamento di un soggetto, detto metodo comprendendo fornire il rilascio prolungato di un agente farmaceuticamente attivo attraverso la pelle di un soggetto somministrando per via topica la composizione nella pelle del soggetto. Qualsiasi composizione come descritta in precedenza e di seguito può essere usata in tali metodi. In forme di realizzazione specifiche, l'estere di acido grasso è presente nella composizione in una quantità nell'intervallo dallo 0,1% al 5% in peso del peso totale della composizione farmaceutica. In alcune forme di realizzazione, il rilascio prolungato dell'agente farmaceuticamente attivo attraverso la pelle si osserva almeno 24 ore dopo la sua somministrazione. In altre forme di realizzazione, il rilascio prolungato dell'agente farmaceuticamente attivo attraverso la pelle si osserva almeno 36 ore dopo la sua somministrazione. In ancora altre forme di realizzazione, il rilascio prolungato dell'agente farmaceuticamente attivo attraverso la pelle si

osserva almeno 48 ore dopo la sua somministrazione.

#### **BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI**

FIG. 1 rappresenta la quantità di progesterone trasportata attraverso la pelle in 48 ore (flusso,  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ore}$ ) per le diverse formulazioni testate nell'esempio 5. (■-Formulazione 1; ● -Formulazione 2; ▲- Progestogel (1% gel idroalcolico di progesterone) (Besins Healthcare)).

FIG. 2 rappresenta la quantità di estradiolo trasportata ( $\mu\text{g}$ ) attraverso la pelle in 48 ore rispetto al carico di farmaco in una formulazione esemplificativa (rombi) e rispetto a Estrogel® (0,06% di gel di estradiolo, quadrato) (Ascend Therapeutics).

FIG. 3 rappresenta l'effetto di concentrazioni di acido oleico, propilene glicole ed estradiolo sulla penetrazione complessiva di estradiolo ( $\mu\text{g}$ ) in 48 ore.

FIG. 4 rappresenta l'effetto di concentrazioni di acido oleico, propilene glicole ed estradiolo sulla penetrazione complessiva di estradiolo ( $\mu\text{g}$ ) in 48 ore.

FIG. 5 rappresenta l'effetto di concentrazioni di etil oleato ed estradiolo sulla penetrazione complessiva di estradiolo ( $\mu\text{g}$ ) in 48 ore.

FIG. 6 rappresenta l'effetto di concentrazioni di etil oleato ed estradiolo sulla penetrazione complessiva di estradiolo ( $\mu\text{g}$ ) in 48 ore.

FIG. 7 rappresenta il profilo di flusso ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ore}$ ) nel tempo per tre composizioni testate nell'esempio 7. (■-Formulazione 301; ● - Formulazione 303; ▲-Formulazione 309.)

FIG. 8 rappresenta il profilo di flusso ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ore}$ ) nel tempo per tre composizioni testate nell'esempio 7. (■-Formulazione 306; ● - Formulazione 307; ▲-Formulazione 311.)

FIG. 9 rappresenta il profilo di flusso ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ore}$ ) nel tempo per cinque composizioni testate nell'esempio 7. (■-Formulazione 302; ● - Formulazione 304; ; ▲-Formulazione 305; ▼-Formulazione 308; ◀ -Formulazione 310.)

FIG. 10 rappresenta la solubilità di etil oleato (g/100g) come funzione della concentrazione di etanolo (96%) (v/v) in una miscela contenente lo 0,24% di estradiolo, il 5% di propilene glicole e il 2% di acido oleico, tutto in peso rispetto al peso totale della composizione.

#### **DESCRIZIONE DETTAGLIATA**

Pochi studi hanno studiato se gli agenti attivi somministrati per via transdermica passano direttamente dalla pelle al flusso sanguigno, o se vengono prima trattenuti all'interno di un compartimento all'interno della pelle che funge da

deposito di conservazione dell'agente attivo, prima di essere rilasciato nella circolazione. È noto, grazie all'articolo dal titolo "Will cutaneous levels of absorbed material be systemically absorbed?" (*Drugs and Pharmaceutical Science*, Vol. 97, 235-239, 1999), che la pelle può fungere da deposito di conservazione per i materiali assorbiti. Per esempio, un deposito di conservazione cutaneo per sostanze chimiche è stato descritto da Vickers, *Adv Biol Skin*. Vol. 12, 177-89 (1972), in quanto esistente nello strato corneo per sostanze chimiche lipofile applicate per via topica come steroidi. Tuttavia, secondo la presente invenzione, è stato scoperto che un deposito di conservazione nel derma può essere più efficace rispetto a un deposito di conservazione nello strato corneo, e può offrire un mezzo migliore per regolare la cinetica di diffusione degli agenti attivi nei tessuti e un trasporto del farmaco più efficace nel tempo. Infatti, il derma costituisce la maggior parte della massa cutanea. Esso contiene una fitta vascolarizzazione sanguigna e linfatica, ed è il sito di assorbimento di farmaco nella circolazione sistemica. Ciononostante, il derma è stato usato di rado come sito per la somministrazione o deposizione di sostanze, probabilmente a causa della difficoltà

nel controllare lo strato della pelle nel quale l'agente attivo viene effettivamente trattenuto. Pertanto, nella presente sono descritte composizioni farmaceutiche transdermiche che mostrano proprietà vantaggiose e ottengono risultati vantaggiosi rispetto ai loro profili di trasporto di farmaco. Per esempio, forme di realizzazione delle composizioni descritte nella presente ottengono un trasporto sistemico di agente/i terapeuticamente attivo/i attraverso gli strati esterni della pelle nel derma, in cui si forma un deposito dal quale l'agente attivo viene trasportato nel flusso sanguigno per un periodo di tempo esteso, per esempio per un periodo di tempo di almeno 12 ore, almeno 24 ore, almeno 36 ore, o almeno 48 ore. Ciò può essere osservato, per esempio, quando l'agente attivo continua a venire rilasciato nel flusso sanguigno fino a 24 ore o più dopo il lavaggio cutaneo. Le composizioni dell'invenzione ottengono inoltre vantaggiosamente un alto livello di trasporto di agente attivo in un ampio intervallo di concentrazioni di agente attivo. In aggiunta, le composizioni sono formulate per promuovere la riproducibilità dei livelli di assorbimento tra diverse applicazioni e tra pazienti diversi. Pertanto, secondo il primo aspetto dell'invenzione, sono fornite

composizioni farmaceutiche transdermiche a rilascio prolungato per la somministrazione topica su una superficie cutanea comprendenti: un agente farmaceuticamente attivo comprendente uno o più steroidi, dallo 0,01% al 5% in peso del peso totale della composizione farmaceutica di un estere di acido grasso, acqua, un monoalcol C2-C6, un acido grasso, e dallo 0,05% al 5% in peso di un agente gelificante, in cui il rapporto peso : peso dell'estere di acido grasso nella composizione rispetto all'agente attivo complessivo in detta composizione è almeno 4:1 estere di acido grasso : agente attivo, preferibilmente nell'intervallo da 4:1 a 20:1. In alcune forme di realizzazione, la composizione comprende ancora inoltre un co-solvente, quale propilene glicole. Possono essere inclusi anche altri componenti convenzionali per le composizioni farmaceutiche transdermiche, come discusso in maggior dettaglio di seguito. In particolare, come discusso in maggior dettaglio negli esempi che seguono, la presente invenzione si riferisce alla scoperta inattesa che fornire un estere di acido grasso in almeno un eccesso di quattro volte rispetto all'agente terapeuticamente attivo (su base p/p) determina una composizione farmaceutica transdermica con proprietà vantaggiose,

incluse rilascio prolungato, profili di trasporto costanti in un intervallo di concentrazioni di agente attivo, e riproducibilità da applicazione ad applicazione e da paziente a paziente. Senza voler essere vincolati da alcuna teoria, si pensa che questo rapporto elevato dell'estere di acido grasso rispetto all'agente attivo faciliti la suddivisione dell'agente attivo nel derma e la formazione di un deposito all'interno del derma, determinando la ritenzione dermica dell'agente attivo in seguito al rilascio prolungato nel flusso sanguigno. Pertanto, le composizioni e i metodi descritti nella presente forniscono anche un metodo per aumentare la ritenzione dermica di un agente attivo, e ottenere un trasporto a rilascio prolungato. Pertanto, secondo il secondo aspetto dell'invenzione vengono fornite composizioni secondo il primo aspetto dell'invenzione per l'uso in un metodo terapeutico di trattamento di un soggetto, detto metodo comprendendo fornire il rilascio prolungato di un agente farmaceuticamente attivo attraverso la pelle di un soggetto somministrando per via topica la composizione nella pelle del soggetto. In alcune forme di realizzazione, la composizione comprende ancora inoltre un co-solvente, quale propilene glicole. Possono essere inclusi anche altri

componenti convenzionali per le composizioni farmaceutiche transdermiche, come discusso in maggior dettaglio di seguito. Come usata nella presente, l'espressione trasporto "prolungato" indica che le composizioni continuano a trasportare l'agente attivo per un periodo di tempo di almeno 12 ore, almeno 24 ore, almeno 36 ore, o almeno 48 ore, incluso un periodo di tempo di almeno 24 ore. Per esempio, le composizioni a trasporto prolungato possono continuare a trasportare l'agente attivo dopo le prime 24 ore in seguito all'applicazione. In alcune forme di realizzazione, le composizioni a trasporto prolungato descritte nella presente continuano a trasportare una quantità terapeuticamente efficace dell'agente attivo dopo le prime 24 ore in seguito all'applicazione. A seconda della composizione e dell'agente attivo, può trattarsi del trasporto dopo le prime 24 ore di, per esempio, almeno il 5%, almeno il 10%, almeno il 15%, almeno il 20%, almeno il 25%, almeno il 30%, o più, della quantità complessiva di agente attivo trasportato. Di nuovo a seconda della composizione e dell'agente attivo, può trattarsi del trasporto dopo le prime 24 ore di, per esempio, almeno il 2%, almeno il 3%, almeno il 4%, almeno il 5% o più, della quantità complessiva di agente attivo applicato nella

composizione. Ciò può essere osservato, per esempio, quando l'agente attivo continua a venire rilasciato nel flusso sanguigno fino a 24 ore o più dopo l'applicazione. In alcune forme di realizzazione, le composizioni a trasporto prolungato descritte nella presente continuano a trasportare agente attivo dopo le prime 12, 24, 36, o 48 ore in seguito all'applicazione, a un livello maggiore rispetto alla quantità trasportata durante lo stesso periodo di tempo da una composizione equivalente che non include un estere di acido grasso. Come illustrato nell'esempio 2, ciò può essere osservato, per esempio, testando una composizione come descritta nella presente e una composizione equivalente che non include un estere di acido grasso (ad esempio, una composizione che sia identica, eccetto che per l'assenza dell'estere di acido grasso) in un saggio da cella di Franz in vitro, in cui le composizioni sono applicate su un campione cutaneo nella cella di Franz, lasciate per 24 ore, e quindi lavate, e quindi il trasporto di farmaco attraverso la pelle dopo il lavaggio (ad esempio, dopo le prime 24 ore in seguito all'applicazione) è determinato e confrontato. Composizioni e metodi sono descritti in maggiore dettaglio di seguito, e illustrati negli esempi. Come

usati nella presente, se non specificato diversamente "un" o "uno" indica "uno o più." Le persone di ordinaria esperienza nella tecnica comprenderanno che "circa", come usato nella presente, varia in qualche misura a seconda del contesto nel quale viene usato. Se esistono usi del termine non chiari alle persone di ordinaria esperienza nella tecnica dato il contesto nel quale esso viene usato, "circa" indicherà fino a più o meno il 10% del termine particolare.

#### **Composizioni Farmaceutiche**

Come notato in precedenza, nella presente sono descritte composizioni comprendenti una quantità terapeuticamente efficace di un agente terapeuticamente attivo e di un estere di acido grasso, in cui il rapporto peso : peso dell'estere di acido grasso nella composizione rispetto all'agente attivo nella composizione è almeno 4:1 estere di acido grasso : agente attivo, preferibilmente nell'intervallo da 4:1 a 20: 1. Le composizioni comprendono un agente terapeuticamente attivo, un estere di acido grasso, acqua, un alcol e un acido grasso. In ulteriori forme di realizzazione particolari, la composizione comprende inoltre un co-solvente, quale propilene glicole. In forme di realizzazione specifiche, la composizione comprende circa il 2% di acido grasso

(quale acido oleico), circa il 2% di estere di acido grasso (quale etil oleato) e circa il 5% di co-solvente (quale propilene glicole). In ulteriori forme di realizzazione specifiche, la composizione comprende il 2% di acido grasso (quale acido oleico), il 2% di estere di acido grasso (quale etil oleato) e il 5% di co-solvente (quale propilene glicole). In altre forme di realizzazione specifiche, la composizione comprende circa lo 0,3% di acido grasso (quale acido oleico), circa lo 0,3% di estere di acido grasso (quale etil oleato) e circa lo 0,75% di co-solvente (quale propilene glicole). In ulteriori forme di realizzazione specifiche, la composizione comprende lo 0,3% di acido grasso (quale acido oleico), lo 0,3% di estere di acido grasso (quale etil oleato) e lo 0,75% di co-solvente (quale propilene glicole). Come evidenziato sopra, come utilizzato nella presente, il termine "circa" comprende più o meno il 10% delle quantità elencate. In alcune forme di realizzazione, la composizione comprende i componenti specificati. In alcune forme di realizzazione, la composizione è costituita dai componenti specificati. In altre forme di realizzazione, la composizione è costituita essenzialmente dai componenti specificati. Come usato nella presente, "è costituito essenzialmente da" i

componenti specificati indica che la composizione include almeno i componenti specificati, e può includere anche altri componenti che sostanzialmente non influenzano le caratteristiche basilari e innovative dell'invenzione. Componenti specifici delle composizioni sono descritti nel dettaglio di seguito.

#### Agenti Attivi

Le composizioni descritte nella presente includono almeno un agente terapeuticamente attivo. L'agente terapeuticamente attivo può per esempio essere una molecola di farmaco di natura generalmente idrofoba, dalle piccole dimensioni, come un peso molecolare inferiore a 500 Dalton. Secondo la presente invenzione, la composizione comprende un agente attivo che è selezionato tra steroidi, inclusi ormoni e ormoni sessuali. Il termine "ormone sessuale" si riferisce a ormoni steroidei naturali o sintetici che interagiscono con recettori androgeni o estrogeni nei vertebrati, come estrogeni, androgeni, anti-androgeni, progestinici, e relative miscele. Quando la composizione comprende più di uno steroide, il rapporto peso : peso dell'estere di acido grasso nella composizione rispetto alla quantità complessiva di steroide nella composizione è almeno 4:1 estere di acido grasso : steroidi, preferibilmente

nell'intervallo da 4:1 a 20:1. Quando la composizione dell'invenzione comprende uno o più steroidi e uno o più agenti terapeuticamente attivi, il rapporto peso : peso dell'estere di acido grasso nella composizione rispetto alla quantità complessiva di agenti attivi nella composizione è almeno 4:1 estere di acido grasso : agenti attivi. Per esempio, ormoni steroidei adatti per l'uso nelle composizioni descritte nella presente includono i numerosi ormoni steroidei naturali e sintetici, inclusi androgeni, estrogeni e progestativi e relativi derivati, come deidroepiandrosterone (DHEA), androstenedione, androstenediolo, diidrotestosterone, testosterone, progesterone, progestinici, estriolo, estradiolo. Altri ormoni steroidei adatti includono glucocorticoidi, calciferolo, pregnenolone, aldosterone, cortisolo e relativi derivati. Ormoni steroidei adatti includono specialmente gli ormoni sessuali aventi effetti estrogenici, progestativi, androgenici o anabolici, come estrogeno, estradiolo e relativi esteri, ad esempio, valerato, benzoato, o undecilato, etinilestradiolo, ecc.; progestinici, come noretisterone acetato, levonorgestrel, clormadinone acetato, ciproterone acetato, desogestrel, o gestodene, ecc.; androgeni, come testosterone e i suoi

esteri (propionato, undecilato, ecc.), ecc.; anabolizzanti, come metandrostenolone, nandrolone e i suoi esteri.

### *Estrogeni*

In forme di realizzazione specifiche, l'uno o più estrogeno/i è/sono selezionato/i dal gruppo costituito da estrogeni naturali, come 17 $\beta$ -estradiolo, estrone, estrogeni equini coniugati, estriolo e fitoestrogeni; estrogeni semi-naturali, come estradiolo valerato; o estrogeni sintetici, come etinil-estradiolo. In alcune forme di realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica per la somministrazione topica su una superficie cutanea comprendente acqua, almeno un agente terapeuticamente attivo selezionato tra estrogeni, un alcol e un estere di acido grasso. In alcune forme di realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica per la somministrazione topica su una superficie cutanea comprendente acqua, almeno un agente terapeuticamente attivo essendo estradiolo, un alcol e un estere di acido grasso. In forme di realizzazione particolari di tali composizioni quando l'agente attivo è estradiolo, la composizione non comprende ulteriormente la combinazione di progesterone, propilene glicole, acido oleico, etil oleato, etanolo, idrossipropilcellulosa

e acqua purificata.

### *Androgeni*

Gli androgeni possono essere selezionati dal gruppo costituito da androgeno naturale, testosterone e i suoi derivati semi-naturali o sintetici, per esempio metiltestosterone; precursori fisiologici del testosterone come deidroepiandrosterone o DHEA, o in alternativa prasterone e i suoi derivati, per esempio DHEA solfato,  $\Delta$ -4-androstenedione e i suoi derivati; metaboliti del testosterone, per esempio diidrotosterone (DHT) ottenuto in seguito all'azione enzimatica di 5- $\alpha$ -riduttasi; o sostanze con un effetto di tipo androgenico, come tibolone. In una forma di realizzazione particolare, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica per la somministrazione topica su una superficie cutanea comprendente acqua, almeno un agente attivo selezionato tra androgeni, un alcol e un estere di acido grasso. In forme di realizzazione particolari di tali composizioni, quando l'agente attivo è testosterone o diidrotosterone (DHT), la composizione comprende inoltre un acido grasso come potenziatore della penetrazione.

### *Anti-Androgeni*

Gli anti-androgeni possono essere selezionati dal

gruppo costituito da composti steroidei come ciproterone acetato e medrossiprogesterone. In una forma di realizzazione particolare, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica per la somministrazione topica su una superficie cutanea comprendente acqua, almeno un agente attivo selezionato tra anti-androgeni, un alcol e un estere di acido grasso.

#### *Progestinici*

Il/i progestinico/i usato/i nella composizione farmaceutica secondo l'invenzione può/possono essere selezionato/i dal gruppo costituito da progestinici naturali, progesterone o i suoi derivati di tipo estere e progestinici sintetici di tipo 1, 2 o 3. Il primo gruppo comprende molecole simili al progesterone o progestinici sintetici 1 (SP1) (pregnani), per esempio l'isomero del progesterone (retroprogesterone), medrogesterone, e derivati di norprogesterone (demegestone o promegestone). Il secondo gruppo comprende derivati di  $17\alpha$ -idrossi-progesterone o progestinici sintetici 2 (SP2) (pregnani), per esempio ciproterone acetato e medrossiprogesterone acetato. Il terzo gruppo comprende norsteroidi o progestinici sintetici 3 (SP3), (estrani o nor-androstani). Essi sono derivati di 19-nortestosterone, per esempio

noretindrone. Questo gruppo comprende anche molecole di tipo gonano, che sono derivate da tali norandrostani o estrani e hanno un gruppo metile in corrispondenza di C18 e un gruppo etile in corrispondenza di C13. Esempi che possono essere citati includono norgestimato, desogestrel (3-ketodesogestrel) o gestodene. In modo vantaggioso può essere selezionato nella composizione farmaceutica secondo l'invenzione tibolone, che ha sia attività progestinica sia androgenica. In una forma di realizzazione particolare, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica per la somministrazione topica su una superficie cutanea comprendente acqua, almeno un agente terapeuticamente attivo selezionato tra progestinici, un alcol e un estere di acido grasso. In forme di realizzazione particolari di tali composizioni quando l'agente attivo è progesterone, la composizione non comprende ulteriormente la combinazione di estradiolo, propilene glicole, acido oleico, etil oleato, etanolo, idrossipropilcellulosa e acqua purificata. In forme di realizzazione particolari, l'agente terapeuticamente attivo nella composizione farmaceutica secondo l'invenzione è un progestinico, un estrogeno o una combinazione dei due. Come notato in precedenza, quando la composizione

comprende più di uno steroide, il rapporto peso : peso dell'estere di acido grasso nella composizione rispetto alla quantità complessiva di agente attivo steroideo nella composizione è almeno 4:1 estere di acido grasso : agente attivo, per esempio nell'intervallo da 4:1 a 20:1. La quantità di agente terapeuticamente attivo presente nella composizione sarà generalmente influenzata dal dosaggio da trasportare per effetto terapeutico e considerazioni sulla formulazione. Le composizioni includono generalmente una quantità terapeuticamente efficace di agente attivo. Come usata nella presente, l'espressione "quantità terapeuticamente efficace" indica una quantità (dosaggio) che ottiene in un soggetto la risposta farmacologica specifica per la quale il farmaco è somministrato. Bisogna sottolineare che una "quantità terapeuticamente efficace" di un farmaco che è somministrato a un soggetto particolare in un caso particolare può non sempre essere efficace nel trattare le condizioni/malattie bersaglio, nonostante gli esperti nella tecnica considerino tale dosaggio una quantità terapeuticamente efficace. Gli esperti nella tecnica riconosceranno che la "quantità terapeuticamente efficace" può variare da paziente a paziente, o da condizione a condizione, e sono in grado

di determinare una "quantità terapeuticamente efficace" per un dato paziente/condizione mediante mezzi di routine. L'agente terapeuticamente attivo è vantaggiosamente presente nella composizione in una quantità nell'intervallo da circa lo 0,01% a circa il 5%, o dallo 0,01% al 5%, incluso da circa lo 0,02% a circa il 3%, o dallo 0,02% al 3%, come da circa lo 0,03% a circa il 2%, o dallo 0,03% al 2%, incluso da circa lo 0,05% a circa lo 0,5%, o dallo 0,05% allo 0,5%, come da circa lo 0,2% a circa lo 0,4%, o dallo 0,2% allo 0,4%, queste percentuali essendo espresse in peso, rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. Le composizioni secondo l'invenzione rivendicata sono solo quelle che hanno in aggiunta il rapporto peso : peso rivendicato tra l'estere di acido grasso e l'agente attivo complessivo. Secondo una forma di realizzazione vantaggiosa, quando l'agente attivo comprende un progestinico, il contenuto di progestinico è nell'intervallo da circa lo 0,01% a circa il 5%, incluso da circa lo 0,05% a circa il 3%, come da circa lo 0,1% a circa l'1%, queste percentuali essendo espresse in peso, rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. Pertanto, il contenuto di progestinico può essere nell'intervallo dallo 0,01% al 5%, incluso dallo 0,05% al 3% per esempio dallo 0,1%

all'1%. Le composizioni secondo l'invenzione rivendicata sono solo quelle che hanno in aggiunta il rapporto peso : peso rivendicato tra l'estere di acido grasso e l'agente attivo complessivo. Secondo un'altra forma di realizzazione, quando l'agente attivo comprende un estrogeno, il contenuto di estrogeno è nell'intervallo da circa lo 0,01% a circa il 5%, incluso da circa lo 0,02% a circa il 3%, come da circa lo 0,03% a circa il 2%, incluso da circa lo 0,05% a circa lo 0,50%, come da circa lo 0,20% a circa lo 0,40%, queste percentuali essendo espresse in peso, rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. Pertanto, il contenuto di estrogeno può essere nell'intervallo dallo 0,01% al 5%, incluso dallo 0,02% al 3%, come dallo 0,03% al 2%, incluso dallo 0,05% allo 0,50%, come dallo 0,20% allo 0,40%, incluso da circa lo 0,30% allo 0,40%. Le composizioni secondo l'invenzione rivendicata sono solo quelle che hanno in aggiunta il rapporto peso : peso rivendicato tra l'estere di acido grasso e l'agente attivo complessivo. In una forma di realizzazione maggiormente preferita, quando l'agente attivo comprende un estrogeno, il contenuto di estrogeno sarà nell'intervallo da circa lo 0,30% allo 0,40%.

Estere di Acido Grasso

Le composizioni descritte nella presente comprendono almeno un estere di acido grasso. Gli esteri di acido grasso adatti per l'uso nella presente includono esteri di acido grasso alifatici a catena lunga contenenti da 8 a 22 atomi di carbonio, per esempio da 12 a 20 atomi di carbonio. Gli esteri di acido grasso possono essere quelli risultanti dalla reazione di un alcol con un acido grasso selezionato, senza limitazioni, dal gruppo costituito da acido caprico (10:0), acido laurico (12:0), acido miristico (14:0), acido palmitico (16:0), acido stearico (18:0), acido oleico (18:1), acido isostearico (18:0), acido palmitoleico (16:1), acido linoleico (18:2) e acido linolenico (18:3). Pertanto, per esempio l'estere di acido grasso può essere opzionalmente selezionato dal gruppo costituito da etil oleato, isopropil oleato, isopropil miristato, isopropil isostearato, isopropil palmitato, etil ottanoato, etil dodecanoato, etil linoleato, etil palmitoleato, etil isostearato ed etil linolenato. In una forma di realizzazione particolare, l'estere di acido grasso è un estere che risulta dalla reazione di un alcol con acido oleico. In una forma di realizzazione, l'estere di acido grasso è un estere che risulta dalla reazione dell'acido grasso formulato

nella composizione con un alcol. In altre forme di realizzazione, l'estere di acido grasso non è un estere che sarebbe causato dalla reazione dell'acido grasso formulato nella composizione con un alcol. In una forma di realizzazione, l'estere di acido grasso non è l'estere che risulta dalla reazione dell'acido grasso formulato nella composizione con l'alcol formulato nella composizione. Per esempio, nel contesto della presente invenzione, i risultati vantaggiosi discussi nella presente, come il trasporto prolungato che si pensa sia dovuto alla formazione di un deposito nel derma, possono essere osservati indipendentemente dal fatto che l'estere di acido grasso formulato nella composizione corrisponda a qualsiasi acido grasso anch'esso formulato nella composizione. Come notato in precedenza, l'estere di acido grasso è presente nella composizione in almeno un eccesso di quattro volte rispetto all'agente terapeuticamente attivo (su base p/p), vale a dire, il rapporto peso : peso dell'estere di acido grasso presente nella composizione rispetto all'agente attivo presente nella composizione è almeno 4:1 estere di acido grasso : agente attivo, preferibilmente nell'intervallo da 4:1 a 20:1. In una forma di realizzazione preferita, il rapporto peso : peso dell'estere di acido grasso presente nella

composizione rispetto all'agente attivo presente nella composizione è nell'intervallo da 4:1 a 15:1, preferibilmente da 5:1 a 10:1, e più preferibilmente da 5:1 a 7:1. Entro questi parametri, il contenuto di estere di acido grasso nella composizione farmaceutica può essere nell'intervallo da circa lo 0,1% al 5% in peso, per esempio da circa lo 0,2% al 5% in peso, incluso da circa lo 0,5% al 5% in peso, tutto in base al peso totale della composizione farmaceutica. Pertanto, le composizioni possono comprendere estere di acido grasso in una quantità dallo 0,1% al 5% in peso, per esempio dallo 0,2% al 5% in peso, incluso dallo 0,5% al 5% in peso. In forme di realizzazione particolari, il contenuto di estere di acido grasso nella composizione farmaceutica può essere nell'intervallo dallo 0,01% al 5%, incluso da circa lo 0,05% a circa il 2,4%, come da circa lo 0,1% a circa il 2,2%, queste percentuali essendo espresse in peso, rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. Pertanto, il contenuto di estere di acido grasso può essere nell'intervallo da circa lo 0,01% al 5%, incluso dallo 0,05% al 2,4% come dallo 0,1% al 2,2%.

#### Acido Grasso

La composizione comprende almeno un acido grasso che

può essere saturo o insaturo, per esempio un acido grasso potenziatore della penetrazione. Acidi grassi idonei per l'uso secondo l'invenzione includono acidi grassi alifatici a catena lunga contenenti da 8 a 22 atomi di carbonio, come da 10 a 18 atomi di carbonio. Gli acidi grassi possono essere selezionati, senza limitazioni, dal gruppo costituito da acido caprico (10:0), acido laurico (12:0), acido miristico (14:0), acido palmitico (16:0), acido stearico (18:0); acido oleico (18:1), acido isostearico (18:0), acido palmitoleico (16:1), acido linoleico (18:2) e acido linolenico (18:3). In una forma di realizzazione particolare, l'acido grasso è acido oleico. In una forma di realizzazione particolare, l'acido grasso formulato nella composizione corrisponde all'estere di acido grasso anch'esso formulato nella composizione, come una composizione comprendente etil oleato e acido oleico. Pertanto, in una forma di realizzazione particolare, la composizione dell'invenzione comprende sia acido oleico sia almeno uno dei suoi esteri corrispondenti. In altre forme di realizzazione, l'acido grasso formulato nella composizione non corrisponde all'estero di acido grasso anch'esso formulato nella composizione. Il contenuto di acido grasso nella composizione farmaceutica secondo la

presente invenzione sarà vantaggiosamente nell'intervallo da circa lo 0,01% a circa il 5%, incluso da circa lo 0,05% a circa il 3,5%, come da circa l'1% a circa il 3%, queste percentuali essendo espresse in peso, rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. Pertanto, il contenuto di acido grasso può essere nell'intervallo da circa lo 0,01% al 5%, incluso dallo 0,05% al 3,5% come dall'1% al 3%.

#### Alcol

Come notato in precedenza, le composizioni dell'invenzione comprendono almeno un monoalcol C2-C6. Come usato nella presente il termine "alcol" si riferisce a una molecola organica contenente almeno un atomo di carbonio e solo un gruppo alcol -OH (monoalcol). Alcoli C2-C6 esemplificativi possono includere alcoli C2-C4, come etanolo, n-propanolo, isopropanolo, n-butanolo, isobutanolo, terz-butanolo, o relative miscele. Senza limitazioni, monoalcol C2-C6 esemplificativi adatti per l'uso nelle composizioni dell'invenzione sono etanolo e isopropanolo. La presenza di tale monoalcol C2-C6 può anche accelerare l'essiccazione della composizione sulla pelle. Per questo motivo, possono essere scelti monoalcoli C2-C6 che hanno un punto di ebollizione nell'intervallo da

circa 70 a circa 130 °C, inclusi nell'intervallo da circa 75 a circa 85 °C. Tipicamente, il monoalcol C2-C6 sarà usato in una quantità nell'intervallo da circa il 10% a circa il 90%, incluso da circa il 20% a circa l'80%, come da circa il 45% a circa il 75%, queste percentuali essendo espresse in peso, rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. Pertanto, il monoalcol C2-C6 può essere presente in una quantità nell'intervallo dal 10% al 90%, incluso dal 20% all'80% come dal 45% al 75%.

#### Co-solvente

La composizione farmaceutica secondo l'invenzione può comprendere inoltre un co-solvente. Co-solventi adatti per l'uso in composizioni farmaceutiche sono noti nella tecnica, come polioli o poliglicoli, vantaggiosamente selezionati dal gruppo costituito da glicerolo, propilene glicole e polietilene glicole. Il co-solvente può essere presente nella composizione dell'invenzione, in una quantità nell'intervallo da circa lo 0,01% a circa il 7%, incluso da circa il 3% a circa il 7%, come da circa il 4% a circa il 6%, queste percentuali essendo espresse in peso, rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. Pertanto, il co-solvente può essere presente in una quantità nell'intervallo dallo 0,01% al 7%, incluso

dal 3% al 7% come dal 4% al 6%. Il co-solvente generalmente aumenta la solubilità dell'agente/i terapeuticamente attivo/i e in particolare può contribuire a mantenere in soluzione l'agente terapeuticamente attivo rimanente sulla superficie cutanea una volta che l'alcol è essiccato. Per questo motivo, possono essere scelti co-solventi che hanno un punto di ebollizione nell'intervallo da circa 150 °C a circa 300 °C, per esempio nell'intervallo da circa 150 °C a circa 200 °C.

#### Agenti Gelificanti

Le composizioni dell'invenzione comprendono almeno un agente gelificante. Come usato nella presente, il termine "agente gelificante" specifica un composto, opzionalmente di natura polimerica, avente la capacità di formare un gel quando a contatto con un solvente specifico, ad esempio, acqua. Agenti gelificanti (ad esempio, addensanti) adatti per l'uso in composizioni farmaceutiche sono noti nella tecnica. Gli agenti gelificanti possono agire per aumentare la viscosità delle composizioni farmaceutiche dell'invenzione. Per esempio, un agente gelificante può fornire alla composizione una viscosità sufficiente per consentire una facile applicazione della composizione sulla pelle. In aggiunta o in alternativa, gli agenti

gelificanti possono agire come agenti solubilizzanti. Esempi di agenti gelificanti includono polimeri anionici come polimeri a base di acido acrilico (inclusi polimeri di acido poliacrilico, ad esempio Carbopol ® di Noveon, Ohio), derivati della cellulosa, polossameri e polossammine, più precisamente, carbomeri che sono polimeri a base di acido acrilico, ad esempio Carbopol® 980 o 940, 981 o 941, 1342 o 1382, 5984, 934 o 934P (i Carbopol® sono di solito polimeri di acido acrilico reticolati con allil saccarosio o allilpentaeritritolo), Ultrez, Pemulen TR1® o TR2® commercializzati da Lubrizol (copolimero ad alto peso molecolare di acido acrilico e alchil acrilato C10-C30 reticolato con allil pentaeritritolo), Synthalen CR, ecc.; derivati della cellulosa come carbossimetilcellulosa, idrossipropilcellulosa (Klucel®, per esempio Klucel HF® o Klucel HPC® venduto da Hercules Incorporated), idrossietilcellulosa, etilcellulosa, idrossimetilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa e simili, e relative miscele; polossameri o copolimeri polietilene-polipropilene come Lutrol® grado 68 o 127, polossammine e altri agenti gelificanti come chitosano, destrano, pectine e gomme naturali. Uno qualsiasi o più di questi agenti gelificanti può essere

usato da solo o in combinazione nelle composizioni farmaceutiche secondo l'invenzione. In un aspetto, l'agente gelificante è selezionato dal gruppo costituito da acidi poliacrilici, cellulosici e relative miscele. In una forma di realizzazione preferita, le composizioni dell'invenzione comprendono Pemulen ® come agente gelificante. L'agente gelificante è usato in una quantità nell'intervallo dallo 0,05% a circa il 5% in peso, incluso da circa lo 0,1% a circa il 3%, come da circa l'1,5% a circa il 2,5% in peso, queste percentuali essendo espresse in peso, rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. Pertanto, l'agente gelificante può essere presente in una quantità nell'intervallo da circa lo 0,05% al 5% in peso, incluso dallo 0,1% al 3%, per esempio dall'1,5% al 2,5% in peso.

#### Idratanti

Le composizioni dell'invenzione possono comprendere opzionalmente almeno un idratante. Come usato nella presente "idratante" specifica un agente che idrata la pelle. Idratanti adatti per l'uso in composizioni farmaceutiche sono noti nella tecnica. Gli idratanti possono essere usati da soli o in combinazione, ad esempio, può essere usata una combinazione di due o tre (o più) idratanti diversi. In alcune forme di

realizzazione, gli idratanti sono selezionati tra emollienti e/o umettanti. Come usato nella presente, "emollienti" specifica sostanze che ammorbidiscono la pelle e tendono a migliorare l'idratazione della pelle. Emollienti adatti per l'uso nelle composizioni farmaceutiche sono ben noti nella tecnica e includono olio minerale, petrolato, polidecene, isoesadecano, acidi grassi e alcoli aventi da 10 a 30 atomi di carbonio; acidi e alcoli pelargonico, laurico, miristico, palmitico, stearico, isostearico, idrossistearico, oleico, linoleico, ricinoleico, arachidico, beenico e erucico; esteri di trigliceride, olio di ricino, burro di cacao, olio di cartamo, olio di girasole, olio di jojoba, olio di semi di cotone, olio di mais, olio di oliva, olio di fegato di merluzzo, olio di mandorla, olio di avocado, olio di palma, olio di sesamo, squalene, olio di kukui, olio di soia, esteri di acetogliceride, gliceridi etossilati, gliceril monostearato etossilato, alchil esteri di acidi grassi aventi da 10 a 20 atomi di carbonio, esil laurato, isoesil laurato, isoesil palmitato, isopropil palmitato, decil oleato, isodecil oleato, esadecil stearato, decil stearato, diisopropil adipato, diisoesil adipato, diisopropil sebacato, lauril lattato, miristil lattato, acetil lattato;

alchenil esteri di acidi grassi aventi da 10 a 20 atomi di carbonio, oleil miristato, oleil stearato, oleil oleato, esteri di acido grasso di alcoli grassi etossilati, esteri di alcol poliidrico, mono- e di-esterei di acido grasso di etilen glicole, mono- e di-esterei di acido grasso di dietilen glicole, polietilen glicole, esteri di cera, cera d'api, spermaceti, miristil miristato, stearyl stearato, oli siliconici, dimeticoni, ciclometiconi. In alcune forme di realizzazione, la composizione comprende uno o più emollienti che sono liquidi a temperatura ambiente. Come usato nella presente "umettanti" specifica sostanze igroscopiche che assorbono acqua dall'aria. Umettanti adatti per l'uso nell'invenzione includono glicerina, propilene glicole, gliceril triacetato, un poliolo, sorbitolo, maltitolo, un poliolo polimerico, polidestrosio, quillaia, acido lattico e urea. Idratanti adatti per l'uso nella presente invenzione possono comprendere ammine, alcoli, glicoli, ammidi, solfossidi e pirrolidoni. In un aspetto, l'idratante è selezionato dal gruppo costituito da acido lattico, glicerina, propilene glicole e urea. In una forma di realizzazione dell'invenzione, l'idratante è usato in una quantità nell'intervallo da circa lo 0,01% a circa il 30% in peso, incluso da circa lo 0,05% a circa il

20% in peso, per esempio da circa lo 0,1% a circa il 10% in peso, incluso da circa lo 0,5% a circa il 5% in peso, queste percentuali essendo espresse in peso, rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. Pertanto, per esempio, può essere usato un idratante in una quantità nell'intervallo dallo 0,01% al 30% in peso, incluso dallo 0,05% al 20% in peso, per esempio dallo 0,1% al 10% in peso, incluso dallo 0,5% al 5% in peso. In una forma di realizzazione, la composizione comprende glicerina in una quantità nell'intervallo da circa lo 0,01% a circa il 30% in peso, incluso da circa lo 0,05% a circa il 20% in peso, per esempio da circa lo 0,1% a circa il 10% in peso, incluso da circa lo 0,5% a circa il 5% in peso, queste percentuali essendo espresse in peso, rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. Pertanto, una composizione può comprendere glicerina in una quantità nell'intervallo dallo 0,01% al 30% in peso, incluso dallo 0,05% al 20% in peso, per esempio dallo 0,1% al 10% in peso, incluso dallo 0,5% al 5% in peso.

#### Veicolo Acquoso

Come notato in precedenza, la composizione dell'invenzione comprende un veicolo acquoso e pertanto include acqua. Veicoli acquosi adatti per

composizioni farmaceutiche sono noti nella tecnica. Secondo un aspetto dell'invenzione, il veicolo acquoso comprende, oltre acqua, ingredienti utili nella regolazione del pH, per esempio almeno un agente tamponante, il quale vantaggiosamente rende possibile mantenere il pH della composizione tra circa 4 e circa 10, per esempio tra circa 5 e circa 9, o tra circa 6 e circa 8, incluso da 4 a 10, da 5 a 9 e da 6 a 8. Secondo una forma di realizzazione particolare della composizione farmaceutica secondo l'invenzione, i tamponi sono selezionati dal gruppo costituito da:

- tamponi basificanti o basici come un tampone fosfato (per esempio fosfato di sodio bibasico o monobasico), un tampone citrato (per esempio citrato di sodio o citrato di potassio), carbonato di sodio, bicarbonato di sodio, inclusa una miscela di carbonato di sodio e bicarbonato di sodio, o
- tamponi neutri come tampone Tris buffer (per esempio tris maleato), o un tampone fosfato.

In una forma di realizzazione preferita, le composizioni dell'invenzione comprendono una miscela di carbonato di sodio e bicarbonato di sodio. Il tampone può essere introdotto nella composizione direttamente, per esempio addizionato sotto forma di polvere, o diluito in acqua, per esempio a una

concentrazione nell'intervallo da 1 a 500 mM. Quindi è possibile introdurre la soluzione tampone liquida nella composizione. Il tecnico esperto comprenderà come regolare la quantità di tampone per ottenere l'effetto tamponante desiderato, a seconda della natura chimica del tampone usato, della forma (in polvere o diluito in acqua) e del pH iniziale e desiderato della composizione. Senza limitarsi a questi valori, si può ragionevolmente stimare che quando i tamponi usati nella composizione sono una miscela di carbonato di sodio e bicarbonato di sodio introdotta sotto forma di polvere (si veda l'esempio 8 della presente domanda), il carbonato di sodio può essere introdotto in una quantità nell'intervallo da circa lo 0,01 allo 0,1%, e il bicarbonato di sodio può essere introdotto in una quantità nell'intervallo da circa lo 0,001 allo 0,01%, queste percentuali essendo espresse in peso, rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. Senza limitarsi a questi valori, si può ragionevolmente stimare che quando il tampone usato nella composizione è una soluzione 60 mM di tampone di carbonato avente un pH = 10,7 (si vedano gli esempi da 1 a 3 della presente domanda), la soluzione tampone 60 mM può essere introdotta in una quantità nell'intervallo da circa l'1% a circa l'80%,

incluso da circa il 5% a circa il 70%, per esempio da circa il 10% a circa il 50%, queste percentuali essendo espresse in peso, rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. Tuttavia, la quantità di tampone nella composizione può ulteriormente variare a seconda della composizione della formula nella quale è introdotto, secondo tecniche tampone standard. In un altro aspetto, la composizione farmaceutica dell'invenzione comprende inoltre una base. In modo vantaggioso, la base è, per esempio, farmaceuticamente accettabile ed è tipicamente selezionata dal gruppo costituito da trietanolamina, idrossido di sodio, idrossido di ammonio, idrossido di potassio, arginina, amminometilpropanolo o trometamina e relative miscele. Nel caso in cui il pH della composizione farmaceutica non è ottimizzato per la somministrazione transdermica, ad esempio, nel caso in cui l'agente gelificante comprende almeno un polimero a base di acido acrilico che determina un pH più acido di quanto desiderato per il prodotto finale, l'uso di una base può contribuire alla neutralizzazione della composizione farmaceutica. Inoltre, l'uso della base (neutralizzante) può migliorare od ottimizzare il rigonfiamento delle catene polimeriche durante la neutralizzazione delle cariche e la formazione dei

sali polimeri. Nelle forme di realizzazione in cui l'agente gelificante comprende un polimero a base di acido acrilico, la base può comprendere trietanolamina. L'uso di una base può anche migliorare od ottimizzare la viscosità. L'esperto nella tecnica saprà come scegliere una quantità adatta di base per l'uso nella composizione e può selezionare la base a seconda della natura dell'agente gelificante presente nella stessa e del contenuto di alcol della composizione. Per esempio, con carbomeri e/o un elevato contenuto di alcol, possono essere selezionati come base trometamina e/o NaOH, in quantità scelte in modo da raggiungere il pH finale desiderato nella composizione.

#### Ulteriori Componenti Opzionali

Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono comprendere opzionalmente altri additivi farmaceutici comuni, inclusi sale/i, stabilizzante/i, antimicrobico/i, come composti di parabene, profumo/i e/o propellente/i. Può essere per esempio vantaggioso includere uno stabilizzante come idrossianisolo butilato (BHA), idrossitoluene butilato (BHT) e acido ascorbico. BHA tuttavia può conferire alle composizioni dell'invenzione una colorazione gialla. Pertanto, in una forma di realizzazione maggiormente

preferita, la composizione dell'invenzione non comprende BHA. A seconda della natura degli ingredienti selezionati, può essere vantaggioso includere un tensioattivo. Tensioattivi adatti per l'uso in composizioni farmaceutiche sono noti nella tecnica, e l'esperto nella tecnica può selezionare tensioattivi adatti per l'uso nella presente invenzione, quali tensioattivi che siano dermatologicamente e/o cosmeticamente accettabili. Esempi degli stessi includono tensioattivi non ionici, per esempio:

- esteri, quali:

- esteri di polietilene glicole con acidi grassi, incluso Labrasol®, che è una miscela di mono-, di- e trigliceridi e di mono e diesteri di polietilene glicole con acidi grassi;

- esteri di saccarosio con acidi grassi, come saccarosio laurato con HLB16; saccarosio palmitato con HLB 16;

- esteri di polioossietilene sorbitano, come composti Tween® incluso Tween® 20, 60 e/o 80;

- copolimeri di ossido di alchilene, come copolimeri di ossido di etilene e ossido di propilene, ad esempio Pluronic®.

Ulteriori esempi includono tensioattivi anionici come

SDS (sodio dodecil solfato), e simili e tensioattivi cationici come cetrimide (alchiltrimetilammonio bromuro) e simili. Tipicamente, i tensioattivi saranno usati nelle composizioni dell'invenzione in una quantità nell'intervallo da circa lo 0,01% a circa il 5% in peso, incluso da circa lo 0,05% a circa il 3% in peso, queste percentuali essendo espresse in peso, rispetto al peso totale della composizione farmaceutica. Pertanto, un tensioattivo può essere usato nelle composizioni in una quantità nell'intervallo dallo 0,01% al 5% in peso, incluso dallo 0,05% al 3% in peso. La composizione farmaceutica secondo l'invenzione può essere sotto forma di una soluzione, un gel, una crema, una lozione, un latte, un unguento, un aerosol o un cerotto. In una forma di realizzazione particolare, la composizione dell'invenzione è sotto forma di un gel o una soluzione.

#### **Composizione e usi esemplificativi**

Composizioni esemplificative e non limitative sono fornite di seguito. Come citato in precedenza, le percentuali (%) si riferiscono a quantità in peso in base al peso totale della composizione (p/p). La somma dei diversi componenti della composizione è pari al 100% (p/p) della composizione totale. In una forma di

realizzazione preferita, la presente invenzione si riferisce a una composizione farmaceutica per la somministrazione topica su una superficie cutanea in cui la composizione comprende:

(i) dallo 0,01 all'1,25% (p/p), preferibilmente dallo 0,30 allo 0,50% (p/p), di un agente farmaceuticamente attivo scelto tra estrogeni, preferibilmente estradiolo,

(ii) dal 20 all'80% (p/p) di almeno un monoalcol C2-C6, come etanolo o isopropanolo,

(iii) dallo 0,04 al 5% (p/p) di un estere di acido grasso, preferibilmente etil oleato

(iv) dallo 0,01 al 5% (p/p) di un acido grasso, preferibilmente acido oleico,

(v) dallo 0,05% al 5% (p/p) di almeno un agente gelificante, preferibilmente un copolimero ad alto peso molecolare di acido acrilico e alchil acrilato C10-C30 reticolato con allil pentaeritritolo, per esempio Pemulen® TR-1,

(vi) q.s. 100% (p/p) acqua,

in cui il rapporto peso : peso dell'estere di acido grasso nella composizione rispetto all'agente attivo complessivo in detta composizione è almeno 4:1 estere di acido grasso : agente attivo, preferibilmente nell'intervallo da 4 : 1 a 7:1. A seconda dell'agente

attivo usato, le composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono essere utili per vari trattamenti. Per esempio, le composizioni possono essere usate in qualsiasi metodo in cui è desiderato il trasporto di un agente farmaceuticamente attivo, e possono essere particolarmente utili quando è desiderato un trasporto prolungato sistemico dell'agente farmaceuticamente attivo. Quando le composizioni dell'invenzione possono essere usate in qualsiasi metodo in cui è desiderato il trasporto di steroide/i, e può essere particolarmente utile quando è desiderato il trasporto prolungato sistemico dello steroide/i. Per esempio, le composizioni possono essere usate in metodi per trattare un paziente affetto da o a rischio di sviluppare qualsiasi condizione che possa essere trattata, migliorata o prevenuta mediante la somministrazione sistemica di uno o più steroidi. Metodi terapeutici esemplificativi, senza limitazioni, includono:

- Quando l'agente attivo è un estrogeno quale estradiolo, un androgeno quale testosterone o DHT, le composizioni dell'invenzione sono utili per trattare un disturbo legato alle ossa come osteoporosi, osteoporosi legata alla menopausa, osteoporosi indotta da glucocorticoidi, morbo di Paget, riassorbimento

osseo anomalo, cancro osseo, perdita ossea (perdita ossea generalizzata e/o perdita ossea localizzata), metastasi ossea (con o senza ipercalcemia), mieloma multiplo o altre condizioni che includono fragilità ossea.

- Quando l'agente attivo è un estrogeno come estradiolo, le composizioni dell'invenzione sono utili per:

- la prevenzione di malattie cardiovascolari o il miglioramento delle funzioni cognitive;

- la gestione dei sintomi della menopausa, come vampate di calore, sudorazione notturna, problemi del sonno (insonnia), stanchezza, secchezza, prurito e bruciore vaginale, perdita del desiderio sessuale, ciclo irregolare, problemi alla vescica e sbalzi d'umore;

- cancro alla prostata; e

- altre terapie includenti la somministrazione sistemica di un estrogeno.

- Quando l'agente attivo è un progestativo come progesterone, le composizioni descritte nella presente sono utili per trattare:

- malattia della mammella benigna, mastodinia, mastopatia, mastalgia ciclica e per prevenire cisti e recidive di tumore benigno.

- sindrome premenstruale, irregolarità mestruali dovute

a disturbi dell'ovulazione o anovulazione, mastopatia benigna, premenopausa, uso aggiuntivo con estrogeno nelle donne post-menopausa, prevenzione dell'iperplasia endometriale nelle donne in menopausa non isterectomizzate trattate con terapia di estrogeno, infertilità dovuta al difetto di fase luteale, minaccia di aborto, e minaccia di parto prematuro, supporto di progesterone durante l'insufficienza ovarica o fallimento ovarico completo, in donne prive delle funzioni ovariche (donazione dell'ovocita), per il supporto di fase luteale durante i cicli di fecondazione in vitro, per il supporto di fase luteale durante cicli spontanei o indotti, nell'infertilità o subinfertilità primaria o secondaria in particolare dovuta alla disovulazione;

e

- altre terapie includenti la somministrazione sistemica di un progestativo.

Quando l'agente attivo è un androgeno come testosterone o DHT, le composizioni dell'invenzione sono utili per trattare:

- ipogonadismo;
- disturbo depressivo, diabete di tipo 2, per aumentare il controllo glicemico, disfunzione erettile, sindrome metabolica, fragilità, angina pectoris, insufficienza

cardiaca congestizia, osteopenia e osteoporosi; e  
- altre terapie includenti la somministrazione sistemica di un androgeno.

Nonostante siano stati forniti gli esempi precedenti, l'esperto nella tecnica comprenderà facilmente che le composizioni descritte nella presente sono utili in qualsiasi contesto in cui il trasporto sistemico di un agente farmacologicamente attivo, come uno o più steroidi, è desiderato. Inoltre, per qualsiasi e tutti gli usi, un esperto nella tecnica sarà in grado di determinare quantità appropriate di gel da applicare quotidianamente per ottenere un livello di trasporto in vivo bersaglio usando un dato gel con una concentrazione di agente attivo data per esempio usando dati di permeazione come quelli presentati nella FIG. 2.

#### **Modi di Somministrazione Esemplicativi**

Come notato in precedenza, le composizioni descritte nella presente sono adatte per la somministrazione transdermica. Per esempio, le composizioni possono essere applicate direttamente su una superficie della pelle, per un'applicazione transdermica/transcutanea non occlusiva diretta. Come usati nella presente, i termini "diretto"/"direttamente" e "non occlusivo" indicano che le composizioni non richiedono una

matrice o membrana per effettuare la somministrazione e pertanto non è necessario che vengano erogate mediante un cerotto, bendaggio, sistema di nastro o simili. Tuttavia, le composizioni opzionalmente possono essere erogate mediante un cerotto, bendaggio, sistema di nastro o simili. Le composizioni possono essere somministrate mediante qualsiasi mezzo efficace per applicare la composizione su una superficie della pelle. Per esempio, le composizioni possono essere applicate manualmente, direttamente usando la mano o con un applicatore come un contagocce o pipetta, un applicatore come un tampone, pennello, panno, cuscinetto, spugna o con qualsiasi altro applicatore, come un supporto solido comprendente carta, cartone o un materiale laminato, incluso materiale comprendente fibre a fiocchi, incollate o fissate in altro modo. In alternativa, le composizioni possono essere applicate come spray aerosol o non aerosol, da un contenitore pressurizzato o non pressurizzato. In alcune forme di realizzazione, le composizioni sono somministrate in dosi misurate, per esempio da un applicatore di dose misurata o da un applicatore comprendente una singola dose della composizione. In alcune forme di realizzazione, la composizione è somministrata su una superficie della pelle per un'area superficiale

definita. La somministrazione di una quantità finita, definita della composizione su un'area superficiale definita permette il controllo della quantità di sostanza attiva che è applicata su un'area superficiale data, vale a dire, il controllo della concentrazione locale. Controllando (ad esempio, limitando) la concentrazione locale, gli effetti collaterali locali, come effetti androgenici locali (inclusi, senza limitazioni: acne, pelle grassa), possono essere minimizzati. In alcune forme di realizzazione, la quantità di composizione somministrata è una quantità finita definita che fornisce una quantità terapeuticamente efficace (ad esempio, una singola dose) di agente attivo.

#### **Metodi per Realizzare le Composizioni**

Gli esperti nella tecnica possono preparare le composizioni farmaceutiche dell'invenzione mediante qualsiasi mezzo adatto, in base alle conoscenze generali comuni. Per esempio, l'agente/gli agenti farmaceuticamente attivo/i possono essere disciolti nell'alcol e miscelati con veicolo acquoso (ad esempio, acqua e altri componenti opzionali di cui sopra) e co-solvente, se usato, seguito dall'addizione degli altri eccipienti, come l'idratante, se usato, e da ulteriore miscelazione. Un agente gelificante, se

viene usato, può essere introdotto in agitazione. Un neutralizzante, se usato, è di solito addizionato alla fine o in prossimità della fine del metodo, per esempio alla composizione altrimenti finale. Per esempio, se la composizione comprende Carbopol®, NaOH o trietanolamina possono essere usati per neutralizzare la composizione. In altri stadi del metodo possono essere addizionati altri componenti opzionali, secondo le procedure note. Per esempio, un conservante, se usato, può essere addizionato in un solvente appropriato in qualsiasi momento adatto del processo. Per esempio, in una forma di realizzazione particolare, i componenti possono essere addizionati e miscelati nel seguente ordine:

1. Addizionare alcol e co-solvente e miscelare finché uniforme.
2. Addizionare lentamente l'agente terapeuticamente attivo e miscelare finché completamente disciolto.
3. Addizionare acido grasso e miscelare finché uniforme.
4. Addizionare estere di acido grasso e miscelare finché uniforme.
5. Addizionare lentamente l'agente gelificante, se usato, e miscelare bene finché completamente idratato.
6. Addizionare lentamente la soluzione tampone, se

usata, e miscelare finché uniforme.

Gli esempi specifici che seguono sono inclusi come illustrativi delle composizioni descritte nella presente. Questi esempi non intendono limitare in alcun modo l'ambito della presente invenzione. Altri aspetti dell'invenzione risulteranno chiari agli esperti nella tecnica alla quale l'invenzione appartiene.

### **Esempi**

#### **Esempio di riferimento 1: Assorbimento in vitro di estradiolo nel derma**

##### **A. Sostanze chimiche e formulazioni**

Nella preparazione delle composizioni farmaceutiche come segue è usato estradiolo triziato [<sup>3</sup>H].

Formulazione	1	2	3	4
Estradiolo (E2) (g)	0,12	0,12	0,24	0,24
acido oleico (OA) (g)	2	2	2	2
etil oleato (EO) (g)	-	2	-	2
propilene glicole (PG) (g)	5	5	5	5
Etanolo 96% (g)	64	72	64	72
Tampone di carbonato (CB) 60 mM, pH 10,7 qs (g)	100	100	100	100

Il contenuto di alcol è adattato per solubilizzare gli ingredienti lipofili.

##### **B. Metodi**

###### 1. Principio del metodo

L'assorbimento percutaneo in vitro è studiato quantitativamente con biopsie di pelle umana collocate in celle di Franz a diffusione (Franz TJ, "Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data", J Invest

Dermatol.1975 Mar;64(3):190-5) permettendo il contatto di un fluido recettore con il derma nel quale la sostanza assorbita è misurata.

## 2. Descrizione delle celle

Una biopsia di pelle viene mantenuta orizzontalmente tra due parti della cella di Franz, delimitando due compartimenti separati indicati come epidermico e dermico. Il compartimento epidermico è costituito da un tappo di cella in vetro da un'area superficiale precisa (1,77 cm<sup>2</sup>), collocato sul lato superiore della pelle. Il compartimento dermico, sul lato inferiore delle biopsie di pelle, comprende un serbatoio dal volume fisso (~6,5 ml) dotato di un'apertura di raccolta laterale. I due elementi sono mantenuti in posizione con un morsetto. Il compartimento dermico è riempito con un fluido recettore costituito da una soluzione di cloruro di sodio a 9 g/l e albumina di siero bovino a 15 g/l. Questo liquido è rimosso del tutto periodicamente attraverso il saggio e sostituito con fluido recettore nuovo usando l'apertura di raccolta laterale. Una doppia camicia di circolazione d'acqua, contenente acqua a 37 °C, circonda la parte inferiore della cella al fine di imitare la temperatura fisiologica della pelle. Per assicurare l'omogeneità della temperatura e del contenuto nel fluido

recettore, nel compartimento dermico è collocata una barra di agitazione e ciascuna cella è collocata su un agitatore magnetico. La parte superiore, o compartimento epidermico, è aperta in corrispondenza dell'estremità esterna, esponendo la superficie cutanea all'area circostante del laboratorio.

### 3. Preparazione di biopsie di pelle

I campioni di pelle addominale umana usati per gli esperimenti sono prelevati da donatori in seguito a procedure di chirurgia plastica. I campioni di pelle sono conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Il giorno prima dell'applicazione delle formulazioni radioattive, in seguito al scongelamento, i grassi sottocutanei sono rimossi (a meno che non sia già stato fatto prima del congelamento), e i campioni di pelle sono rimossi con un dermatomo ad approssimativamente  $350\ \mu\text{m}$ . I campioni di pelle sono montati sulle celle il giorno prima dell'applicazione della formulazione radioattiva.

### 4. Procedure operative

Dieci microlitri ( $\approx 1\ \mu\text{Ci}$ ) delle preparazioni sono applicati sulla superficie dell'epidermide delimitata dal tappo di cella in vetro. Durante l'esperimento, il fluido recettore viene completamente rimosso a distanza di 2, 4, 6, 8 e 24 ore attraverso l'apertura di raccolta laterale. Il compartimento dermico è

quindi riempito nuovamente con soluzione nuova. Alla fine della prova (24 ore), il farmaco residuo rimanente sulla superficie della pelle è rimosso lavando la superficie. L'epidermide è separata dal derma raschiando leggermente con un bisturi.

#### 5. Trattamento dei campioni e misurazione della radioattività

La radioattività contenuta nei campioni ottenuti come precedentemente descritto viene misurata usando un contatore beta a scintillazione liquida dotato di software dedicato.

#### 6. Espressione dei risultati ottenuti per il derma:

La quantità di estradiolo che è stata trovata nel derma viene espressa in quantità equivalenti a ng o in percentuali della dose somministrata. Ciascun risultato rappresenta il valore medio di (n) determinazioni sperimentali ed è associato alla sua deviazione standard.

#### 7. Risultati e discussione:

N°	Formulazioni	(n)	Quantità di Estradiolo (ng) recuperata nel derma dopo 24 ore	% di Estradiolo recuperata nel derma dopo 24 ore	Test statistico di Mann-Whitney *
1	E2 0,12% + OA 2% + PG 5% + Etanolo 64% + CB	15	704 ± 244	7,08 ± 2,48	Valore P Form.1/Form.2 = 0,0004
2	E2 0,12% + OA 2% + EO 2% + PG 5% + Etanolo 72% + CB	16	1219 ± 418	12,63 ± 4,33	
3	E2 0,24% + OA 2% + PG 5% + Etanolo 64% + CB	16	1557 ± 568	7,79 ± 2,83	Valore P Form.3/Form.4 = 0,003
4	E2 0,24% + OA 2% + EO 2% + PG 5% + Etanolo 72% + CB	17	2563 ± 847	13,07 ± 4,27	

\* eseguito sulla % di Estradiolo recuperata nel derma con dati a 24 ore

Questi risultati mostrano che a entrambe le concentrazioni di estradiolo testate, l'aggiunta di etil oleato induce un aumento significativo (almeno di 1,5 volte) della ritenzione di estradiolo nel derma ( $p < 0,01$ ). (Confrontare i risultati con la Formulazione 2 vs 1 e 4 vs 3).

### **Esempio di riferimento 2: Assorbimento in vitro di testosterone nel derma**

#### **A. Sostanze chimiche e formulazioni**

Nella preparazione delle composizioni farmaceutiche come segue è usato testosterone triziato [3H].

Formulazione		1	2
Testosterone (T)	(g)	0,24	0,24
acido oleico (OA)	(g)	2	2
etil oleato (EO)	(g)	-	2
propilene glicole (PG)	(g)	5	5
Etanolo 96%	(g)	64	72
Tampone di carbonato (CB) 60 mM, pH 10,7 qs	(g)	100	100

Il contenuto di alcol è adattato per solubilizzare gli ingredienti lipofili.

#### **B. Metodi e risultati**

Con le due formulazioni di testosterone descritte in precedenza si seguono le procedure operative descritte nell'esempio 1. Dopo 24 ore, il farmaco residuo rimanente sulla superficie cutanea è rimosso lavando cella per cella la superficie cutanea appena prima di

riempire nuovamente il compartimento dermico con fluido recettore fresco. Le celle sono quindi monitorate per altre 24 ore. Dopo 48 ore, il fluido recettore è raccolto e l'epidermide è separata dal derma raschiando leggermente con un bisturi. Il derma è separato dalla parte inferiore della cella. Gli strati di epidermide e derma sono digeriti per qualche ora a 60 °C per l'estrazione di radioattività in 1 ml (epidermide) o in 3 ml (derma) di Soluene 350™ (PACKARD).

a) Ritenzione nel derma dopo 48 ore:

N°	Formulazioni	(n)	Quantità di testosterone (ng) recuperata nel derma dopo 48 ore	% di testosterone recuperata nel derma dopo 48 ore	Test statistico di Mann-Whitney *
1	T 0,24% + OA 2% + PG 5% + Etanolo 64% + CB	8	1308 ± 627	6,54 ± 3,13	Valore P Form.1/Form.2 = 0,046
2	T 0,24% + OA 2% + EO 2% +PG 5% + Etanolo 72% + CB	8	2069 ± 772	10,54 ± 3,93	

\* eseguito sulla % di Testosterone recuperata nel derma con dati a 48 ore

Questi risultati mostrano che l'addizione di etil oleato induce un aumento significativo (almeno di 1,5 volte) della ritenzione dermica ( $p < 0,05$ ), anche quando misurato 2 giorni dopo l'applicazione e 1 giorno dopo il lavaggio della pelle.

b) Rilascio nel serbatoio tra 24 ore e 48 ore:

N°	Formulazioni	(n)	Quantità di Testosterone (ng) assorbita tra 24 ore e 48 ore	% di Testosterone assorbita tra 24 ore e 48 ore	Test statistico di Mann-Whitney *
1	T 0,24% + OA 2% +	8	916 ± 133	4,57 ± 0,67	Valore P

	PG 5% + Etanolo 64% + CB				Form.1/Form.2 < 0,001
2	T 0,24% + OA 2% + EO 2% +PG 5% + Etanolo 72% + CB	8	1582 ± 292	8,06 ± 1,49	

I risultati mostrano anche un impatto significativo dell'etil oleato sull'assorbimento di penetrazione 24 ore dopo il lavaggio della pelle. Questi risultati mostrano chiaramente che le composizioni e i metodi dell'invenzione forniscono un rilascio prolungato di agente attivo di testosterone dalla pelle per 24 ore dopo il lavaggio della pelle.

### **Esempio di riferimento 3: Assorbimento in vitro di testosterone nel derma**

#### **A. Sostanze chimiche e formulazioni**

Nella preparazione delle composizioni farmaceutiche come segue è usato testosterone triziato [3H].

Formulazione		1	2
Testosterone (T)	(g)	0,24	0,24
acido miristico (MA)	(g)	2	2
isopropil miristato (IPM)	(g)	-	2
propilene glicole (PG)	(g)	5	5
isopropanolo	(g)	56	56
Tampone di carbonato (CB) 60 mM, pH 10,7 qs	(g)	100	100

Il contenuto di alcol è adattato per solubilizzare gli ingredienti lipofili.

#### **B. Metodi e risultati**

Con le due formulazioni di testosterone descritte in precedenza si seguono le procedure operative descritte nell'esempio 1.

N°	Formulazioni	(n)	Quantità di testosterone (ng) recuperata nel derma dopo 24 ore	% di testosterone recuperata nel derma dopo 24 ore	Test statistico di Mann-Whitney *
1	T 0,24% + MA 2% +	9	334 ± 172	1,59 ± 0,82	Valore P

	PG 5% + isopropanolo 56% + CB				Form.1/Form.2 = 0,001
2	T 0,24% + MA 2% + IPM 2% +PG 5% + isopropanolo 56% + CB	8	885 ± 287	4,31 ± 1,40	

\* eseguito sulla % di Testosterone recuperata nel derma con dati a 24 ore

Questi risultati mostrano che alla concentrazione di testosterone testata, l'aggiunta di isopropil miristato induce un aumento significativo (almeno di 2,5 volte) della ritenzione dermica dopo 24 ore ( $p < 0,01$ ).

#### **Esempio di riferimento 4: Assorbimento in vitro di diidrotosterone nel derma**

##### **A. Sostanze chimiche e formulazioni**

Nella preparazione delle composizioni farmaceutiche come segue è usato diidrotosterone triziato [3H].

Formulazione		1	2
diidrotosterone (DHT)	(g)	0,7	0,7
Etanolo 95%	(g)	71	71
isopropil miristato (IPM)	(g)	0,5	1
Carbopol 980™	(g)	0,5	0,5
trietanolamina (TEA)	(g)	0,5	0,5
acqua qs	(g)	100	100

##### **B. Metodi e risultati**

Con le due formulazioni di DHT descritte in precedenza si seguono le procedure operative descritte nell'esempio 1.

N°	Formulazioni	(n)	Quantità di DHT (ng) recuperata nel derma dopo 24 ore	% di DHT recuperata nel derma dopo 24 ore	Test statistico di Mann-Whitney *
1	Gel DHT con 0,5% IPM	7	676 ± 186	2,50 ± 0,69	Valore P Form.1/Form.2 < 0,05
2	Gel DHT con 1,0% IPM	6	1758 ± 509	6,67 ± 1,93	

\* eseguito sulla % di DHT recuperata nel derma con

dati a 24 ore

Questi risultati mostrano che un aumento della percentuale di IPM nel gel induce una ritenzione dermica significativa ( $p < 0,05$ ) di diidrotestosterone (almeno di 2 volte) dopo 24 ore.

**Esempio di riferimento 5: Valutazione dell'assorbimento percutaneo di progesterone usando il modello della dose finita per la pelle umana di Franz**

**A. Introduzione**

Il modello della dose finita per la pelle umana di Franz in vitro si è dimostrato uno strumento valido per lo studio dell'assorbimento percutaneo e la determinazione della farmacocinetica dei farmaci applicati per via topica. Il modello usa pelle chirurgica o di cadavere ex vivo umana montata in camere di diffusione progettate appositamente che consentono alla pelle di essere mantenuta a una temperatura e umidità che corrispondano alle condizioni tipiche in vivo (Franz, TJ, "Percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data", J Invest Derm 1975, 64:190-195.). Una dose finita (per esempio, 4-7 mg/cm<sup>2</sup>) di formulazione viene applicata sulla superficie esterna della pelle e l'assorbimento del farmaco è misurato monitorando la sua velocità di comparsa nella soluzione del serbatoio che bagna la

superficie interna della pelle. Grazie a questo modello è possibile determinare in modo preciso i dati definenti l'assorbimento totale, la velocità di assorbimento e anche il contenuto nella pelle. Il metodo ha un precedente storico per la previsione precisa in vivo della cinetica di assorbimento percutaneo (Franz TJ, "The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man." In: Skin: Drug Application and Evaluation of Environmental Hazards, Current Problems in Dermatology, vol. 7, G. Simon, Z. Paster, M. Klingberg, M. Kaye (Ed.), Basel, Switzerland, S. Karger, 1978, pag. 58-68).

### **C. Progetto dello studio**

La farmacocinetica dell'assorbimento percutaneo del progesterone è stata studiata da due prove e una formulazione di riferimento usando il modello della dose finita in vitro su pelle umana usando uno studio, in un singolo centro, in aperto, su donatore, di tre (3) formulazioni in gel topiche contenenti progesterone. Ciascuna formulazione è stata testata in tre copie su tre diversi donatori di pelle usando il modello cutaneo a dose finita di Franz in vitro.

### **D. Prodotti dello studio e dosaggio**

Prodotto di riferimento: Progestogel commerciale (1%

gel idroalcolico di progesterone) (Besins Healthcare).

Prodotto/i di prova:

Nuova formulazione #1:

Progesterone	1%
Etanolo (USP 190 Proof)	72%
Propilen glicole	5%
Acido oleico	2%
Etil oleato	2%
Pemulen TR-1	2%
Tampone di carbonato (pH 10,8)	qs 100%

Nuova formulazione #2:

Progesterone	3%
Etanolo (USP 190 Proof)	72%
Propilen glicole	5%
Acido oleico	2%
Etil oleato	2%
Pemulen TR-1	2%
Tampone di carbonato (pH 10,8)	qs 100%

(Il tampone di carbonato è stato preparato da 16,91 parti di acqua, 0,070 parti di carbonato di sodio e 0,007 parti di bicarbonato di sodio.)

#### Dosaggio

5 µL formulazione/cm<sup>2</sup>/sezione di pelle (dosato mediante pipetta e spalmato usando una barra di vetro). La barra di vetro è mantenuta per l'analisi come parte

della responsabilità di bilancio di massa e per la correzione della dose applicata.

### **E. Procedure di studio**

#### 1. Reagenti e fonti di standard

Tutti i reagenti usati in questo studio sono di qualità reagente analitico o migliori.

#### 2. Mezzo di serbatoio

Per la prova di integrità della pelle, la base del mezzo è costituita da soluzione salina tamponata con fosfato (pH  $7,4 \pm 0,1$ ). Per tutti gli ulteriori studi condotti, la base del mezzo è costituita da 0,1x PBS con 0,1% Volpo (un tensioattivo non ionico: Volpo (Oleth-20) è un tensioattivo non ionico noto perché aumenta la solubilità acquosa di composti scarsamente solubili in acqua. Volpo nella soluzione del serbatoio assicurerà la diffusione di condizioni di sink durante l'assorbimento percutaneo, ed è noto che non influenza le proprietà di barriera della pelle di prova).

#### 3. Cella di diffusione e preparazione della pelle

In questo studio è usata pelle di tronco ex vivo umana senza segni evidenti di malattia cutanea. Essa è stata rimossa con un dermatomo, criopreservata, sigillata in un sacchetto di plastica impermeabile all'acqua, e conservata a  $\sim -70$  °C fino al giorno dell'esperimento. Prima dell'uso è scongelata in acqua a  $\sim 37$  °C, quindi

sciacquata con acqua di rubinetto per rimuovere sangue aderente o qualsiasi altro materiale dalla superficie. La pelle da un singolo donatore viene tagliata in diverse sezioni più piccole grandi abbastanza da adattarsi alle celle di diffusione di Franz nominalmente da 1,0 cm<sup>2</sup>. La camera dermica è riempita del tutto con una soluzione di serbatoio di soluzione salina isotonica tamponata con fosfato (PBS), pH 7,4 ± 0,1, e la camera epidermica è lasciata aperta all'ambiente del laboratorio. Le celle sono quindi collocate in un apparecchio di diffusione nel quale la soluzione di serbatoio dermico è agitata magneticamente a ~ 600 RPM e la sua temperatura è mantenuta per ottenere una temperatura di superficie di pelle di 32,0 ± 1,0 °C. Per assicurare l'integrità di ciascuna sezione di pelle, viene determinata la sua permeabilità all'acqua triziata prima dell'applicazione dei prodotti di prova (Franz TJ, Lehman PA: The use of water permeability as a means of validation for skin integrity in vitro percutaneous absorption studies. Abst. J Invest Dermatol 1990, 94:525). In seguito a un breve periodo di equilibrio (0,5-1 ore), <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O (NEN, Boston, MA, sp. Act. ~ 0,5 µCi/mL vengono stratificati sulla parte superiore della pelle mediante un contagocce in modo da ricoprire

l'intera superficie esposta (approssimativamente 200 - 500  $\mu\text{L}$ ). Dopo 5 minuti, lo strato di  $^3\text{H}_2\text{O}$  acquoso viene rimosso. A 30 minuti, la soluzione di serbatoio viene raccolta e analizzata per il contenuto radioattivo con conteggio mediante scintillazione liquida. I campioni di pelle nei quali l'assorbimento di  $^3\text{H}_2\text{O}$  è inferiore a 1,56  $\mu\text{L-equ}/\text{cm}^2$  sono considerati accettabili.

#### 4. Somministrazione di dose e raccolta del campione

Prima della somministrazione delle formulazioni di prova topiche sulle sezioni di pelle, viene raccolto un campione pre-dose e la soluzione di serbatoio viene sostituita con una soluzione nuova di PBS 0,1x con lo 0,1% di Volpo. Successivamente, ciascun prodotto di prova viene applicato in sezioni triplicate di pelle dallo stesso donatore. Il dosaggio viene eseguito usando un kit di pipette a spostamento positivo per trasportare 5  $\mu\text{L}$  di formulazione/ $\text{cm}^2$  con la dose applicata spalmata sulla pelle usando una barra di vetro. La barra di vetro è mantenuta per l'analisi come parte della responsabilità di bilancio di massa. In momenti prelezionati dopo il dosaggio (4, 8, 12, 24, 32 e 48 ore), la soluzione di serbatoio viene rimossa del tutto, sostituita con soluzione di serbatoio nuova, e un'aliquota di volume predefinita

viene conservata per l'analisi successiva. Dopo la raccolta dell'ultimo campione, la superficie viene lavata due volte con 50:50 metanolo:acqua (volume di 0,5 mL ogni volta) per raccogliere la formulazione non assorbita dalla superficie della pelle. In seguito al lavaggio, la pelle intatta viene quindi rimossa dalla camera ed estratta in 50:50 metanolo:acqua.

#### 5. Laboratorio analitico

La quantificazione del progesterone è eseguita mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC - High performance liquid chromatography). Brevemente, la HPLC viene condotta su un sistema HPLC serie 1100 Hewlett-Packard con un rilevatore UV a serie di diodi e, se necessario, una spettroscopia di massa (MS) usando l'attuale metodo di laboratorio. Le aree di picco sono quantificate alla concentrazione usando una curva standard esterna preparata quotidianamente dallo standard puro. I campioni non saggiati del giorno della raccolta sono conservati a o al di sotto di -20 °C.

### **F. Analisi e rapporti**

#### 1. Parametri di studio

Sono calcolati i seguenti parametri:

a) Assorbimento totale (somma di tutte le soluzioni di serbatoio campionate da una camera)

b) Velocità ed entità della penetrazione durante il periodo di studio.

c) Lavaggio superficiale e contenuto cutaneo.

## 2. Valutazione dei dati

a) Se un campione è <LLD (Limite inferiore di rilevazione - Lower Limit of Detection) esso deve essere trattato come valore non informativo. A discrezione del ricercatore, tutti i valori LLQ (limite inferiore di quantificazione - Lower Limit of Quantification) possono essere dichiarati come valori zero o un valore effettivo misurato allo scopo di calcolare parametri chiave.

b) Un valore anomalo sospetto è confermato usando la prova di anomalia di Dean e Dixon. A discrezione del ricercatore, i valori dichiarati come valori anomali possono essere rimossi dalla somma complessiva dei dati (ma saranno indicati come tali nel testo o nelle tabelle di dati).

c) All'interno di una camera, se un dato valore di punto temporale è stato dichiarato un valore non informativo, o manca a causa di altri motivi; il valore di punto temporale può essere sostituito con un valore inserito per calcolare i parametri rilevanti. Il valore inserito sarà calcolato su una linea che collega i valori adiacenti come segue:

● Dati 3 punti:  $(T_1, A)$ ,  $(T_2, B)$  e  $(T_3, C)$  con  $(B)$  mancante,

● in cui  $T$  = tempo e  $A-C$  = valori di dati misurati

●  $B$  stimato =  $A - [((A-C)/|T_1-T_3|) \times (|T_1-T_2|)]$

### 3. Valutazione statistica

Le repliche all'interno dei donatori sono sottoposte a media e per ciascun parametro chiave viene calcolata la deviazione standard. Le medie entro i donatori sono quindi confrontate e viene calcolata la media per la popolazione di donatori con l'errore standard. Vengono valutate le differenze tra gli articoli di prova usando il test  $T$  di Student.

## G. Risultati

I risultati sono espressi in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Fonte	Nuova form. #1 1% Progesterone	Nuova form. #2 3% Progesterone	Lotto di Progestogel # 427
Serbatoio	11,00 $\pm$ 1,74	6,76 $\pm$ 0,68	2,67 $\pm$ 0,93
Pelle	3,91 $\pm$ 1,06	31,76 $\pm$ 12,30	1,07 $\pm$ 0,23
Superficie	18,76 $\pm$ 0,86	80,01 $\pm$ 11,98	40,00 $\pm$ 1,32
Recupero totale (%)	93,97 $\pm$ 0,75	99,33 $\pm$ 0,77	101,40 $\pm$ 0,914

La formulazione con l'1% di progesterone ottiene un trasporto di principio attivo nel compartimento di serbatoio di più di 4 volte superiore rispetto alla formulazione di Progestogel commerciale con la stessa concentrazione di progesterone attivo (1%). La formulazione con il 3% di progesterone trasporta meno attivo nel serbatoio rispetto alla formulazione all'1% in un periodo di 48 ore, ma carica una quantità molto

più elevata di farmaco nella pelle (31,7 vs 3,9 µg), prevedendo in questo modo un rilascio di attivo dalla pelle nel serbatoio per un periodo di tempo maggiore. La FIG. 1 illustra i profili di penetrazione per le tre formulazioni testate.

**Esempio 6: Valutazione dell'assorbimento percutaneo di estradiolo usando il modello della dose finita per la pelle umana di Franz**

Viene seguito lo stesso protocollo dell'esempio 5 descritto, con le differenze evidenziate di seguito. Sono state testate quattro diverse formulazioni in gel contenenti lo 0,36% di estradiolo, ciascuna con il 2% di acido oleico, il 2% di etil oleato e il 5% di propilene glicole. Le variabili della formulazione (ad esempio, tampone e agente gelificante) sono fornite nella tabella 6-1. La penetrazione di farmaco cumulativa dopo 48 ore era nell'intervallo da 1,03 a 1,77 µg, con un trasporto massimo rilevato tra 8 e 20 ore (si veda la tabella 6-3). I risultati sono confrontati nella tabella 6-3 di seguito con i risultati per due lotti di gel di estradiolo allo 0,06% (un lotto preparato per questi esperimenti e un campione di prodotto commerciale, si veda la tabella 6-2 per la composizione della formulazione di gel di estradiolo allo 0,06%), in cui la penetrazione

cumulativa del farmaco dopo 48 ore era di circa 0,07 µg, con un trasporto massimo rilevato dopo otto ore. Pertanto, l'aumento di sei volte della concentrazione di estradiolo (dallo 0,06% allo 0,36%) ha determinato un aumento tra le 15 e le 25 volte del trasporto di farmaco cumulativo. Da questo si può concludere che la penetrazione aumentata non può basarsi solamente su una concentrazione aumentata, ma deve essere stata influenzata anche dalla progettazione della formulazione.

**Tabella 6-1. Formulazioni di estradiolo allo 0,36%**

Formulazione	Composizione
A	Gel di estradiolo allo 0,36% contenente 2% di acido oleico, 2% di etil oleato, 5% di propilene glicole Tampone di carbonato - 1,7% Klucel HF (Lotto# 818-0909A01)
B	Gel di estradiolo allo 0,36% contenente 2% di acido oleico, 2% di etil oleato, 5% di propilene glicole Nessun tampone - 3,0% Carbopol 981 (Lotto# 818-0924A02)
C	Gel di estradiolo allo 0,36% contenente 2% di acido oleico, 2% di etil oleato, 5% di propilene glicole Tampone di carbonato - 2,0% Pemulen TR-1 (Lotto# 818-911A06)
D	Gel di estradiolo allo 0,36% contenente 2% di acido oleico, 2% di etil oleato, 5% di propilene glicole Tampone di carbonato - 3,0% Klucel HF (Lotto# 818-0911A02)

**Tabella 6-2: Composizione di riferimento di Estrogel®**

Formulazione	Estrogel®
Estradiolo	0,06%
Etanolo	40%
Carbopol 980™	1%
trietanolamina (TEA)	1%
acqua qs	100%

**Tabella 6-3: Assorbimento totale sulla pelle dei donatori**

Assorbimento percutaneo di estradiolo attraverso la pelle di cadavere umana intatta a 48 ore da una singola applicazione. Media ± SE come percentuale di dose

applicata e massa totale ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Parametro	Formulazione A	Formulazione B	Formulazione C	Formulazione D	Estrogel® (Lotto# 769-0929A02)	Estrogel® (prodotto commerciale)
Penetrazione cumulativa a 24 ore ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	0,835 ± 0,007	0,725 ± 0,404	0,993 ± 0,608	0,521 ± 0,181	0,031 ± 0,026	0,024 ± 0,021
Penetrazione cumulativa a 48 ore ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	1,556 ± 0,239	1,570 ± 0,674	1,765 ± 0,862	1,031 ± 0,421	0,071 ± 0,011	0,065 ± 0,008
Penetrazione cumulativa a 48 ore (%)	8,643 ± 1,328	8,721 ± 3,746	9,805 ± 4,787	5,728 ± 2,340	2,358 ± 0,369	2,166 ± 0,255

Questi risultati mostrano che la formulazione C ha reso un trasporto massimo, di circa 25 volte superiore rispetto alla formulazione Estrogel®. La formulazione C è stata successivamente studiata a concentrazioni di estradiolo inferiori per determinare dose-risposta. I risultati (FIG. 2) mostrano che la quantità di farmaco trasportato è aumentata con l'aumento della concentrazione di estradiolo applicato. I risultati ottenuti alla concentrazione più alta (0,36%) coincidono con i dati ottenuti in questo esempio (Tabella 6-3, Formulazione C). In aggiunta, i valori ottenuti per Estrogel® (0,06% di estradiolo) coincidono strettamente con i due studi, supportando ulteriormente la loro affidabilità. I risultati raffigurati nella FIG. 2 mostrano anche che persino a concentrazioni di estradiolo grossomodo equivalenti (0,07% vs 0,06%), la nuova formulazione (C) ha trasportato circa 10 volte più farmaco rispetto alla formulazione Estrogel®. Pertanto, le composizioni

descritte nella presente permettono il trasporto di una dose equivalente a quella del prodotto in gel transdermico commerciale esistente con un volume applicato di 10 volte inferiore, come nel caso della formulazione C contenente estradiolo allo 0,07%. Ciò rappresenta un vantaggio significativo, che include vantaggi di sicurezza, vantaggi normativi e un risparmio dei costi dovuti alla necessità di una quantità di prodotto inferiore per fornire una dose equivalente. Per esempio, le agenzie normative spesso incoraggiano lo sviluppo di prodotti che contengano la quantità minima di agente attivo richiesta per l'efficacia terapeutica.

**Esempio 7: Valutazione delle influenze della formulazione sull'assorbimento percutaneo di estradiolo usando il modello della dose finita per la pelle umana di Franz**

Al fine di studiare l'influenza dei potenziatori di penetrazione e del co-solvente sull'assorbimento percutaneo dell'attivo nelle nuove formulazioni in gel dell'invenzione, è stato eseguito un esperimento, progettato statisticamente, in due fasi. Nella prima fase, è stata studiata l'influenza della variazione delle concentrazioni di acido oleico e co-solvente (propilene glicole), insieme alla concentrazione di

estradiolo, sulla quantità totale di attivo trasportato. Nella seconda fase, è stata studiata l'influenza della variazione delle concentrazioni di etil oleato ed estradiolo sulla quantità di attivo trasportato e sul profilo temporale del trasporto. Per generare i punti di dati sperimentali usati nello studio è stato usato il software statistico "Design-Expert" (disponibile da StatEase su [www.statease.com](http://www.statease.com)). Viene seguito lo stesso protocollo dell'esempio 5 descritto, con le differenze evidenziate di seguito.

#### **A. Prima fase dello studio**

Per la prima fase, è usata una progettazione ottimale D combinata con acido oleico e propilene glicole quali componenti della miscela e con estradiolo come fattore numerico (processo). Le concentrazioni di acido oleico e di propilene glicole sono modificate in modo tale che il totale delle loro due concentrazioni rimanga costante ed uguale al 7%, minimizzando in questo modo le potenziali differenze di solubilità tra le formulazioni. La tabella di seguito riassume le formulazioni che sono state preparate e testate in tre copie su campioni da due donatori diversi. Ciascuna formulazione conteneva in aggiunta: etanolo al 72%, etil oleato al 2% e Pemulen TR-1 al 2%. Le formulazioni 203, 206, 207, 213 e 220 sono formulazioni di

riferimento.

Formulazione #	Prova	% Estradiolo	% Acido oleico	% Propilen glicole	% Tampone di Carb.
206	6	0,05	0,00	7,00	16,95
213	13		0,00	7,00	16,95
214	14		3,47	3,53	16,95
208	8		7,00	0,00	16,95
216	16		7,00	0,00	16,95
211	11	0,16	1,40	5,60	16,84
215	15		4,90	2,10	16,84
205	5	0,26	7,00	0,00	16,74
210	10		7,00	0,00	16,74
207	7	0,28	0,00	7,00	16,72
201	1		3,35	3,65	16,72
212	12		3,50	3,50	16,73
219	19	0,38	5,60	1,40	16,62
204	4	0,41	1,46	5,54	16,59
218	18		3,50	3,50	16,59
203	3	0,50	0,00	7,00	16,50
220	20		0,00	7,00	16,50
217	17		3,21	3,79	16,50
202	2		7,00	0,00	16,50
209	9		7,00	0,00	16,50

In aggiunta, sono eseguite le seguenti fasi:

#### Valutazione di potenza

La potenza di estradiolo delle formulazioni finali può essere determinata in tre copie mediante HPLC/UV. La potenza può essere calcolata come (p/v) per calcolare la quantità di massa di estradiolo nella dose applicata, in modo che la percentuale assorbita della dose applicata possa essere calcolata. La potenza si può calcolare anche, correggendo la densità, in (p/p), per confrontarla con la potenza bersaglio delle formulazioni preparate indicata nella tabella precedente. La potenza di estradiolo deve essere entro  $\pm 5,0\%$  per essere accettabile per questo studio. Nell'analisi dei dati sono usate le concentrazioni di estradiolo effettive di ciascuna formulazione.

#### Preparazione della formulazione:

1. Addizionare etanolo e propilene glicole e miscelare finché uniforme.
2. Addizionare lentamente estradiolo e miscelare finché completamente disciolto.
3. Addizionare acido oleico e miscelare finché uniforme.
4. Addizionare etil oleato e miscelare finché uniforme.
5. Addizionare lentamente Pemulen TR-1 e miscelare bene finché completamente idratato.
6. Addizionare lentamente la soluzione tampone di carbonato alla matrice in gel precedente e miscelare finché uniforme.

### **B. Seconda fase dello studio**

Per la seconda fase, è usata una progettazione risposta-superficie con una struttura composta centrale. Le formulazioni da studiare sono mostrate nella seguente tabella, con l'aggiunta di: etanolo al 72%, Pemulen TR-1 al 2%, acido oleico al 2% e propilene glicole al 5%. Le formulazioni 301, 303, 304, 307-309 e 311 sono formulazioni di riferimento.

Formulazione #	Prova	A: Estradiolo %	B: EtilOleato %	% Tampone di Carb.
305	5	0,05	1,00	17,95
311	11	0,12	0,29	18,59
302	2		1,71	17,18
303	3	0,28	0,00	18,73
304	4		1,00	17,73
307	7			17,73
308	8			17,73
310	10		2,00	16,73
301	1	0,43	0,29	18,27
306	6		1,71	16,86

309	9	0,50	1,00	17,50
-----	---	------	------	-------

Il resto della procedura sperimentale corrisponde a quello della prima fase dello studio.

### **C. Risultati dalla prima fase dello studio**

Come descritto nella sezione A. precedente nel paragrafo "Valutazione di potenza", di ciascuna formulazione viene controllata l'effettiva concentrazione di estradiolo. I valori misurati sono mostrati nella tabella che segue, e sono usati nell'analisi dei dati.

F #	Cono bersaglio (%)	Cono misurato (%)
201	0,28	0,29
202	0,50	0,48
203	0,50	0,48
204	0,41	0,43
205	0,26	0,24
206	0,05	0,05
207	0,28	0,27
208	0,05	0,05
209	0,50	0,49
210	0,26	0,24
211	0,16	0,16
212	0,28	0,28
213	0,05	0,05
214	0,05	0,06
215	0,16	0,16
216	0,05	0,04
217	0,50	0,50
218	0,41	0,42
219	0,38	0,37
220	0,50	0,42

La qualità dei dati di penetrazione totale (quantità di attivo penetrata nel compartimento di serbatoio dopo 48 ore) è risultata sufficiente per consentire l'analisi in modo statisticamente significativo con modelli quadratici per parti di miscela e processo della progettazione. La FIG. 3 illustra la superficie di risposta ottenuta. Con la sostituzione graduale del propilene glicole (parte anteriore del grafico) con

acido oleico (parte posteriore del grafico), la variazione dell'assorbimento in funzione della concentrazione di estradiolo passa da una curva a campana a una curva costante piatta. Una curva a campana è determinata da una forte dipendenza dell'assorbimento dalla concentrazione di agente terapeuticamente attivo nella formulazione, come nel caso, per esempio, di formulazioni aventi concentrazioni elevate di propilene glicole e basse di acido oleico. Tale dipendenza dalla concentrazione di agente terapeuticamente attivo non è auspicabile, dato che le composizioni in grado di ottenere un trasporto efficace per intervalli maggiori di concentrazioni di agente attivo sono generalmente preferibili da un punto di vista normativo e commerciale. All'altra estremità dell'asse acido oleico/propilene glicole, vale a dire nella regione ad elevato acido oleico/basso propilene glicole, non si osserva la dipendenza dell'assorbimento dalla concentrazione di estradiolo, e l'assorbimento totale raggiunge livelli assoluti maggiori, molto probabilmente dovuti all'efficienza dell'acido grasso come potenziatore di penetrazione. Tuttavia, come si può vedere nella FIG. 3 per le repliche condotte allo 0,26 e 0,5% di estradiolo, la riproducibilità dei punti di dati sperimentali non è

buona. Questa mancanza di riproducibilità è confermata guardando il grafico dell'errore standard per la stessa serie di dati (non mostrato - l'errore aumenta con l'aumento delle concentrazioni di acido oleico), e anche i dati individuali per ciascun punto sperimentale, costituito da 3 repliche su due donatori diversi. Tale diffusione dell'assorbimento da un campione di donatore all'altro, e anche tra repliche dello stesso campione di donatore indica l'instabilità del sistema. In effetti, alcuni esperimenti trasportano grandi quantità di attivo mentre altri esperimenti, nonostante tutti i parametri sperimentali siano mantenuti costanti, trasportano un attivo significativamente inferiore. Tale comportamento non è auspicabile in una composizione farmaceutica, perché una volta in clinica, queste formulazioni possono determinare ampie variazioni da paziente a paziente o anche variazioni nello stesso paziente da un'applicazione all'altra. Per questi motivi, sarebbe vantaggioso selezionare intervalli di concentrazioni di acido grasso e co-solvente che non includano le più alte e le più basse concentrazioni di propilene glicole/acido oleico studiate nella presente. Illustrando ulteriormente questo punto, la FIG. 4 rappresenta una vista dall'alto al basso dei dati

illustrati tridimensionalmente nella FIG. 3. La regione mediana, centrata intorno a 2% di acido oleico e 5% di propilene glicole, appare la più auspicabile per una composizione che mostri un assorbimento con una dipendenza minima dalla concentrazione di agente attivo (il problema riscontrato con concentrazioni superiori di propilene glicole) pur ottenendo una forte riproducibilità tra i punti di dati (al contrario dei dati ottenuti con concentrazioni superiori di acido oleico), nonostante non fornisca il trasporto più alto di attivo. In forme di realizzazione specifiche, pertanto, l'acido grasso potenziatore di permeazione è presente in una quantità dallo 0,01% al 5%, incluso dallo 0,05% al 3,5%, per esempio dall'1% al 3%, in peso in base al peso totale della composizione. In aggiunta, in forme di realizzazione specifiche, il co-solvente (per esempio propilene glicole) è presente in una quantità dallo 0,01% al 7%, incluso dal 3% al 7%, per esempio dal 4% al 6% in peso in base al peso totale della composizione.

#### **D. Risultati dalla seconda fase dello studio**

Le FIGG. 5 e 6 illustrano l'influenza delle concentrazioni di etil oleato ed estradiolo sull'assorbimento totale in 48 ore. La variazione della concentrazione di estradiolo influenza

l'assorbimento in una modalità curva a campana, come già illustrato nella prima fase dello studio, alle concentrazioni di acido oleico e propilene glicole corrispondenti. L'aggiunta di etil oleato ha l'effetto di aumentare la quantità di assorbimento totale e anche di spostare la concentrazione di estradiolo ottimale (vale a dire, la concentrazione di estradiolo corrispondente all'assorbimento massimo) su valori maggiori. Questo fenomeno risulta più chiaramente visibile nella FIG. 6. L'effetto principale dell'estere (etil oleato), tuttavia, come precedentemente descritto negli esempi da 1 a 4, è quello di modificare il profilo di trasporto nel tempo, fornendo un effetto di rilascio prolungato. Per illustrare questo fenomeno, i grafici rappresentanti i corsi temporali dei flussi di assorbimento per le 11 composizioni testate sono stati raggruppati in 3 categorie, illustrate nelle FIGG. da 7 a 9. La FIG. 7 mostra i profili di flusso per un primo gruppo che innesca dopo circa 20 ore un aumento del flusso, che porta a un profilo in cui la dose aumenta con il tempo. Ciò non è auspicabile per un prodotto in cui si cerca un forte trasporto a distanza di ore dall'applicazione seguito da un plateau di rilascio stabile del farmaco. I tre punti di dati illustrati nella FIG. 7

appartengono tutti all'angolo con "basso etil oleato" - "alto estradiolo" nel grafico della FIG. 6. La FIG. 8 mostra profili di flusso di un secondo gruppo, in cui il flusso diminuisce rapidamente dopo il picco che si verifica a 6 ore dalla somministrazione. Questo profilo è tipico di molte composizioni della tecnica precedente, che ottengono un trasporto veloce ed efficiente entro le prime ore che seguono la somministrazione, ma che mancano di un rilascio stabile per un termine più lungo, vale a dire 24 o persino 48 ore. I tre punti di dati illustrati nella FIG. 8 sono lungo la linea  $Y=X$  nel grafico della FIG. 6. Infine, la FIG. 9 mostra profili di punti di dati sperimentali con un aumento rapido e precoce del flusso, seguito da un livello di flusso stabile per 2 giorni, vale a dire, un effetto di deposito di conservazione e rilascio prolungato. Questo tipo di flusso è auspicabile in molte terapie, in cui sono desiderati sia un rapido raggiungimento di concentrazioni nel sangue e concentrazioni nel sangue prolungate terapeutiche del farmaco. Le composizioni che ottengono questo tipo di profilo sono composizioni secondo la presente invenzione entro la metà del grafico con "alto etil oleato" - "basso estradiolo" della FIG. 6 (in altri termini, sopra la linea  $Y = X$ ).

Questa analisi qualitativa dei profili di flusso nel tempo dimostra che un rilascio prolungato di agente attivo si ottiene in modo soddisfacente quando è presente l'estere di acido grasso in quantità superiore rispetto all'agente attivo, per esempio l'estere di acido grasso essendo presente in una quantità superiore di almeno quattro volte rispetto a quella dell'agente attivo, in base a peso:peso. In particolare, risulta evidente che maggiore è la quantità di estere presente nella composizione, migliore sarà l'effetto di deposito di conservazione. Questo fattore suggerisce che bisognerebbe mirare a includere una quantità più alta possibile di estere di acido grasso nella composizione. Tuttavia, la solubilità dell'estere di acido grasso nella composizione impone un limite superiore. Come esempio, la FIG. 10 illustra la quantità di etil oleato che può essere disciolta, a temperatura ambiente, in funzione della concentrazione di etanolo (96% v/v) in una formulazione realizzata con:

0,24% di estradiolo;

5% di propilene glicole; e

2% di acido oleico

Acqua qs.

Dalla FIG. 10 e dalla tabella che segue, appare

evidente che in una formulazione comprendente il 72% di etanolo, può essere disciolto al massimo il 2,2% di etil oleato.

Concentrazione di EtOH (96% v/v) nella miscela	Quantità di etil oleato solubilizzata in g/100 g
64 %	0,65 g/100 g
66 %	0,91 g/100 g
68 %	1,28 g/100 g
70 %	1,60 g/100 g
72 %	2,19 g/100 g
73 %	2,40 g/100 g

### **Esempio 8: Studi sulla sensibilizzazione cutanea**

Studi precedenti riportavano problemi di irritazione della pelle con le composizioni transdermiche comprendenti quantità elevate di co-solventi, come propilene glicole, alle quantità usate in alcune forme di realizzazione descritte nella presente, per esempio a circa il 5% (p/p). Al fine di determinare se le composizioni descritte nella presente sono irritanti e quindi potenzialmente non adatte all'uso clinico diffuso, sono stati condotti studi sulla sensibilizzazione cutanea su cavie e conigli, usando le seguenti formulazioni:

#### **K36 attivo:**

Nome chimico	% p/p
Acqua purificata USP	16,91
Alcol USP 190 Proof	71,95
Propilene glicole USP/EP	5,00
Acido oleico purissimo NF	2,00
Etil oleato NF	2,00
Estradiolo USP	0,36
Idrossipropil cellulosa NF (Klucel HF)	1,70
Bicarbonato di sodio USP	0,007
Carbonato di sodio NF	0,07

#### **P36 attivo:**

Nome chimico	% p/p
Acqua purificata USP	16,91
Alcol USP 190 Proof	71,65
Propilene glicole USP/EP	5,00
Acido oleico purissimo NF	2,00
Etil oleato NF	2,00
Estradiolo USP	0,36
Pemulen TR-1	2,00
Bicarbonato di sodio USP	0,007
Carbonato di sodio NF	0,07

### **K36 placebo:**

Nome chimico	% p/p
Acqua purificata USP	16,91
Alcol USP 190 Proof	72,30
Propilene glicole USP/EP	5,00
Acido oleico purissimo NF	2,00
Etil oleato NF	2,00
Idrossipropil cellulosa NF (Klucel HF)	1,70
Bicarbonato di sodio USP	0,007
Carbonato di sodio NF	0,07

### **P36 placebo:**

Nome chimico	% p/p
Acqua purificata USP	16,91
Alcol USP 190 Proof	72,00
Propilene glicole USP/EP	5,00
Acido oleico purissimo NF	2,00
Etil oleato NF	2,00
Pemulen TR-1	2,00
Bicarbonato di sodio USP	0,007
Carbonato di sodio NF	0,07

Questi studi sono condotti per valutare il potenziale delle composizioni di prova, K36 attivo e P36 attivo, per causare o suscitare reazioni di sensibilizzazione cutanea (dermatite da contatto allergica) tramite applicazioni di cerotti per via topica su modelli animali.

Cavie: Le composizioni sono applicate mediante un cerotto topico chiuso e applicazione in camera di Hilltop per cavie Crl:HA (Albino Hartley). Durante la fase di induzione, è stato somministrato K36 placebo, P36 placebo o il controllo positivo, aldeide esilcinnamica (HCA 100%), a tre gruppi di trattamento di cinque animali/sexo/gruppo, mentre i due gruppi di

trattamento rimanenti di dieci animali/sexo/gruppo hanno ricevuto le composizioni di prova, K36 attivo o P36 attivo. Durante la fase di stimolazione, a ciascun gruppo placebo viene somministrata la rispettiva composizione di prova, e il controllo positivo riceve il 50% di HCA in olio minerale (50% di HCA). Durante entrambe le fasi, a tutti i gruppi vengono somministrati i placebo, il controllo positivo o le composizioni di prova mediante applicazione dermica a 0,4 mL/dose. Durante la fase di induzione, i placebo, il controllo positivo e le composizioni di prova sono somministrati una volta alla settimana per 3 settimane nei giorni 1, 8 e 15, seguiti da 2 settimane di periodo di wash out, mentre durante la fase di stimolazione, il controllo positivo e gli articoli di prova sono somministrati una volta il giorno 29. Per tutta la durata dello studio, le osservazioni su morbilità, mortalità, lesioni e disponibilità di cibo e acqua sono condotte due volte al giorno per tutti gli animali. In aggiunta, il peso corporeo di tutti gli animali viene misurato e registrato prima della casualizzazione (giorno -7), prima della somministrazione di ciascuna composizione di prova (ad eccezione di giorno 15, il peso corporeo è stato registrato approssimativamente 6 ore dopo la dose in

seguito all'apertura), e il giorno prima della conclusione (giorno 31). Solo durante la fase di stimolazione, è condotta l'analisi di sensibilizzazione cutanea dell'irritazione dermica approssimativamente a 24 e 48 ore dopo la rimozione del cerotto (dopo la dose). A studio concluso, gli animali sono sottoposti a eutanasia mediante inalazione di biossido di carbonio. I risultati dell'analisi dell'irritazione dermica registrati 24 e 48 ore dopo la dose durante la fase di stimolazione indicavano che non si è verificata sensibilizzazione in seguito alla somministrazione di dosi di induzione e al successivo periodo di wash out di due settimane. I risultati dell'analisi dell'irritazione nei gruppi K36 attivo e P36 attivo erano generalmente equivalenti o inferiori ai risultati registrati per i gruppi K36 placebo e P36 placebo. In aggiunta, nei gruppi K36 attivo e P36 attivo è stato osservato un aumento di peso ridotto al confronto dei rispettivi gruppi placebo. Tali aumenti di peso inferiore sono stati considerati un fattore legato all'articolo di prova ma non avverso.

Conigli: Questo studio viene condotto per valutare i potenziali effetti irritanti e/o corrosivi dermici delle composizioni di prova. Sono state somministrate

a un gruppo di trattamento di tre femmine di coniglio albino bianco della Nuova Zelanda Hra:(NZW)SPF formulazioni K36 e P36 attive e i loro rispettivi placebo, su uno dei quattro siti dorsali a un livello di dose di 0,5 mL/sito. I placebo e gli articoli di prova sono somministrati sui rispettivi siti di prova su ciascun animale tramite applicazione dermica, una volta al giorno, per 3 giorni consecutivi. Le osservazioni su morbilità, mortalità, lesioni e disponibilità di cibo e acqua sono condotte due volte al giorno per tutti gli animali. Il peso corporeo viene misurato e registrato predose. L'analisi dell'irritazione dermica viene condotta entro 30-60 minuti, e 4 e 24 ore dopo la dose nei giorni 1 e 2. Giorno 3, i siti di prova sono analizzati entro 30-60 minuti, e a 4, 24, 48 e 72 dopo la dose. Analisi dell'irritazione aggiuntive sono eseguite nei giorni 8 e 15 per valutare completamente la reversibilità o irreversibilità degli effetti osservati. Una volta concluso lo studio, tutti gli animali sono sottoposti a eutanasia, e le carcasse sono scartate senza valutazioni ulteriori. Sono stati osservati eritema ed edema da minimi a leggeri per entrambe le formulazioni K36 e P36 sia placebo sia attive. P36 placebo e P36 attivo sembrano causare una irritazione leggermente

maggiore rispetto a K36 placebo e K36 attivo, nonostante si tratti di differenze minime. Su tutti e tre gli animali è stata osservata una leggera diminuzione di peso corporeo ed essa è stata considerata legata all'articolo di prova, ma non avversa. Questi studi dimostrano che le composizioni descritte nella presente, comprendenti circa il 5% di propilene glicole non sono irritanti, e non determinano effetti di sensibilizzazione della pelle rilevanti. Pertanto, questi fattori non costituiranno una limitazione al loro uso clinico.

**Esempio 9: Studio sulla tossicità dermica di 21 giorni su conigli**

Questo studio è condotto per valutare la potenziale tossicità delle due formulazioni delle composizioni di prova descritte in precedenza, K36 attivo e P36 attivo, e dei loro rispettivi placebo quando somministrati una volta al giorno tramite applicazione dermica per 21 giorni consecutivi su due gruppi di trattamento di dieci maschi e dieci femmine di coniglio albino bianco della Nuova Zelanda Hra:(NZW)SPF. Sia K36 attivo sia P36 attivo sono formulati a una concentrazione attiva dello 0,36% di estradiolo. Gli articoli di prova sono somministrati a un volume di dose di approssimativamente da 0,85 a 1,11 mL. Due gruppi

aggiuntivi di dieci animali/sexo fungeranno da controllo e riceveranno i placebo, K36 placebo e P36 placebo. Le osservazioni su morbilità, mortalità, lesioni e disponibilità di cibo e acqua sono condotte due volte al giorno per tutti gli animali. Le osservazioni cliniche sono condotte settimanalmente. I siti di prova sono sottoposti a valutazione per eritema ed edema quotidianamente durante la prima settimana di dosaggio, e settimanalmente in seguito. Il peso corporeo viene misurato e registrato settimanalmente. Il consumo di cibo viene misurato e registrato quotidianamente. Prima della prova e prima della necropsia conclusiva vengono raccolti da tutti gli animali campioni di sangue e urine per le valutazioni di patologia clinica. Alla conclusione dello studio, sono eseguiti esami necroptici e il peso degli organi viene registrato. Tessuti selezionati vengono esaminati al microscopio per gli animali che hanno ricevuto P36 attivo e placebo. I tessuti dagli altri due gruppi dello studio sono conservati come possibile riferimento futuro. Non ci sono stati cambiamenti del peso corporeo legati alla composizione di prova e neanche chiare scoperte cliniche legate alla composizione di prova. Scoperte cliniche legate alla composizione di prova possibili includevano

inappetenza, comportamento aggressivo e vocalizzazione. Queste scoperte sono state limitate a un animale per sesso per gruppo trattato con K36 attivo o con P36 attivo, e non sono state osservate in alcun gruppo placebo. Un eritema molto leggero (appena percettibile) è stato osservato sporadicamente nel corso dello studio con una frequenza simile o inferiore nei gruppi K36 attivo e P36 attivo rispetto ai rispettivi gruppi placebo. Queste scoperte sono state considerate legate primariamente al veicolo e non legate alla composizione di prova. È stata osservata una diminuzione del consumo di cibo legata alla composizione di prova, ma non avversa, sia nei gruppi K36 attivo sia P36 attivo rispetto ai rispettivi gruppi placebo. Il consumo di cibo dei maschi è stato influenzato più fortemente (18,4% - 19,2%) e spesso statisticamente significativo, mentre il consumo di cibo delle femmine è stato influenzato moderatamente (6,5% - 11,1%) e solo occasionalmente statisticamente significativo. Cambiamenti dei parametri ematologici legati alla composizione di prova includevano una diminuzione moderata dei livelli di eritrociti, emoglobina, ematocrito, reticolociti, e piastrine sia nei gruppi K36 attivo sia P36 attivo. Anche leucociti e linfociti sono diminuiti in questi gruppi.

Cambiamenti legati alla composizione di prova dei parametri di chimica clinica includevano aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT),  $\gamma$ -glutamilttransferasi (GGT), sorbitolo deidrogenasi (SDH), azoto ureico e creatinina aumentati, e trigliceridi diminuiti in entrambi i gruppi K36 attivo e P36 attivo. L'aumento negli enzimi epatici tendeva a essere leggermente maggiore nei maschi che hanno ricevuto P36 rispetto a quelli che hanno ricevuto K36. Gli aumenti di azoto ureico e creatinina erano minimi e potevano essere secondari. Non ci sono stati cambiamenti legati alla composizione di prova dei parametri di coagulazione o di analisi delle urine. Non ci sono state scoperte macroscopiche legate alla composizione di prova nei maschi di questo studio. Le osservazioni macroscopiche legate alla composizione di prova nelle femmine del gruppo P36 attivo includevano cisti nell'ovidotto in tre animali e un'adesione della cavità addominale nella quale utero e cervice aderivano alla parete addominale in un animale. È stata eseguita un'osservazione macroscopica probabilmente legata alla composizione di prova di scolorimento rosso in corpo e corno uterino di un coniglio femmina del gruppo K36 attivo. Nonostante l'analisi al microscopio non sia stata eseguita, è

probabile che questa osservazione sia correlata a lesioni simili a quelle evidenziate nei conigli femmina del gruppo P36 attivo. Alterazioni statisticamente significative del peso degli organi legate alla composizione di prova si sono verificate per il peso di fegato, milza e timo di maschi e femmine sia nel gruppo P36 attivo sia in quello K36 attivo, e per il peso di utero e cervice delle femmine da entrambi i gruppi P36 attivo e K36 attivo. Alterazioni microscopiche legate alla composizione di prova si sono verificate in fegato, milza e timo di maschi e femmine, in prostata e vescichette seminali nei maschi, e in ovidotti, utero e cervice e vagina delle femmine. All'interno del fegato, si è verificato un impoverimento diffuso delle riserve di glicogeno intraepatocellulari. In aggiunta si è verificata un'iperplasia dei dotti biliari da minima a leggera. L'iperplasia biliare possibilmente è stata un effetto diretto dell'articolo di prova, in quanto è stato mostrato che gli estrogeni stimolano la proliferazione di colangiociti (LeSage, G., S. Glaser e G. Alpini. "Regulation of Cholangiocyte Proliferation." Liver 21 (2001): 73-80.). All'interno della milza si è verificata un'iperplasia da minima a moderata dei macrofagi reticoloendoteliali che occasionalmente

risultava accompagnata da un'eritrofagocitosi aumentata, da aumento dei macrofagi pigmentati (carichi di emosiderina) e raramente dalla dilatazione dei seni della polpa rossa nella milza. In aggiunta, si è verificato un impoverimento da minimo a moderato della popolazione linfoide della milza negli animali trattati. Queste alterazioni possono essere entrambe dovute a effetti diretti della composizione di prova in quanto è stato mostrato che gli estrogeni nei ratti stimolano le cellule reticuloendoteliali della milza determinando una fagocitosi aumentata (Steven, W.M. e T. Snook. "The Stimulatory Effects of Diethylstilbesterol and Diethylstilbesterol Diphosphate on the Reticuloendothelial Cells of the Rat Spleen." American Journal of Anatomy 144.3 (1975): 339-359), e inoltre, è stato mostrato che alti livelli di estrogeni causano una diminuzione delle popolazioni di cellule T- e B- all'interno della milza di ratti (Burns-Naas, L.A., B.J. Meade e A.E. Munson. "Toxic Response of the Immune System." Cassarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Ed. Curtis D. Klaassen. New York: McGraw-Hill, 2001. 419-470.). I cambiamenti timici riguardavano un impoverimento da leggero a grave dei linfoidi generalizzato. È stato mostrato che gli estrogeni causano l'impoverimento

timico (Burns-Naas, *supra*). Alterazioni microscopiche della ghiandola prostatica e delle vescichette seminali degli animali trattati includevano ipertrofia del muscolo liscio associato a entrambe queste ghiandole e occasionalmente gli animali riscontravano una fibroplasia aumentata con lo stroma subepiteliale che determina un ispessimento del setto intraghiandolare nella ghiandola prostatica. In aggiunta a questi cambiamenti stromali, si è verificata una dismaturità o regressione dell'epitelio ghiandolare, che significa che l'epitelio era di maturità diminuita (immaturità aumentata) rispetto alle altre caratteristiche della ghiandola quali il diametro luminale aumentato. Tra le femmine trattate, è stata riscontrata una mucificazione da lieve a grave dell'epitelio vaginale e un'ipertrofia da lieve a moderata del muscolo liscio vaginale. Una scoperta simile era presente nell'epitelio della regione cervicale dell'utero. Una reazione deciduale (Zook, B.C., O.A. Janne, A.A. Abraham, e H.A. Nash. "The Development and Regression of Deciduosarcomas and Other Lesions Caused by Estrogens and Progestins in Rabbits." Toxicologic Pathology 29.4 (2001): 411-416; Jaane, O.A., B.C. Zook, A.K. Didolkar, K. Sundaram, e H.A. Nash. "The Roles of Estrogen and Progestin in

Producing Deciduosarcoma and Other Lesions in the Rabbit." Toxicologic Pathology 29.4 (2001): 417-421), una risposta comune ai composti estrogenici, è stata riscontrata almeno in misura minima in tutti i campioni uterini e in due milze dalle femmine del gruppo P36 attivo. La reazione deciduale si verifica sia all'interno dello stroma subendometriale sia nei vasi sanguigni all'interno dell'utero. Nei conigli con i vasi gravemente colpiti, in associazione si è verificata necrosi ischemica dei tessuti uterini adiacenti causata dall'apporto di sangue interrotto. Questa necrosi è stata occasionalmente transmurale, e in un coniglio, ha determinato una fibrosi sulla superficie addominale dell'utero e adesione alla superficie parietale della cavità addominale. Ancora nelle femmine, tre degli animali del gruppo P36 attivo avevano cisti nell'ovidotto. Le cisti non sono rare in vari organi riproduttivi femminili, quindi è possibile che queste cisti rappresentino anomalie di sviluppo, tuttavia la presenza di queste cisti in tre femmine del gruppo P36 attivo e in nessun animale di controllo suggerisce che questa alterazione possa essere legata alla somministrazione dell'articolo di prova. Non vi erano differenze significative tra i gruppi di trattamento K36 attivo e P36 attivo. In generale,

queste scoperte sono comunemente associate con la somministrazione di una composizione di prova contenente estrogeni, e quindi non compromettono la potenziale utilità clinica delle formulazioni specifiche descritte nella presente.

**Esempio 10: Studio di intensificazione della dose in 12 soggetti maschi umani sani**

È stato progettato uno studio di intensificazione della dose, in aperto, multi-dose in cui è stata programmata la somministrazione a 12 soggetti maschi sani di 1 di 2 trattamenti una volta al giorno per 3 giorni con un periodo di wash out di 11 giorni tra le dosi. Lo scopo di questa fase 1 dello studio era di verificare la sicurezza e il profilo farmacocinetico (PK) della somministrazione di molteplici dosi di 0,25 e 1,00 g di un gel di estradiolo transdermico allo 0,07% in volontari maschi sani. Il gel transdermico usato aveva la seguente formulazione:

0,07%	estradiolo
2,0%	etil oleato
2,0%	acido oleico
5,0%	propilen glicole
16,91%	acqua purificata
71,94%	etanolo
2,0%	Carbomer pemulen TR-1
0,07%	carbonato di sodio anidro
0,007%	bicarbonato di sodio anidro

Dodici (12) soggetti sani sono stati arruolati e hanno partecipato a due periodi di trattamento in aperto. I soggetti che hanno completato con successo il processo di controllo sono stati accettati nel centro di ricerca

il giorno 1, approssimativamente da 1 a 2 ore prima del primo prelievo di sangue di ciascun periodo di trattamento. Per il periodo di trattamento A, dovevano essere somministrati una volta al giorno per tre giorni 0,25 g del gel allo 0,07%. Durante il periodo di trattamento B, dovevano essere somministrati una volta al giorno per tre giorni 1,0 g del gel allo 0,07%. I giorni del dosaggio dovevano essere separati da un periodo di wash out di almeno 11 giorni. Diagnosi e Criteri principali per l'inclusione: Volontari maschi adulti sani, di età compresa fra 18 e 45 anni, con un indice di massa corporea (BMI) tra 18 e 30 kg/m<sup>2</sup>, compresi, e un peso minimo di 50 kg (110 libbre).

### Risultati:

Tabella di sinossi 1: Parametri di estradiolo

Dose	0,25 g				1,00 g			
	N	Media	SD	CV%	N	Media	SD	CV%
Tmax0-24 (ore)	12	12,83	10,14	79,04	11	6,91	5,97	86,33
Tmax24-48 (ore)	12	32,67	9,59	29,34	11	28,18	2,89	10,24
Tmax48-72 (ore)	12	51,17	3,64	7,11	11	54,91	6,16	11,21
Tmax0-120 (ore)	12	33,58	18,68	55,63	11	29,82	20,66	69,28
Tmax-totale (ore)	12	54,83	56,78	103,56	11	29,82	20,66	69,28
Cmax0-24 (pg/mL)	12	26,4	7,35	27,83	11	56,5	20,8	36,74
Cmax24-48 (pg/mL)	12	29,7	11,3	38,04	11	52,1	27,3	52,43
Cmax48-72 (pg/mL)	12	28,5	15,1	52,95	11	49,2	22,5	45,73
Cmax0-120 (pg/mL)	12	33,1	16,5	50,02	11	64,6	27,1	42,04
Cmax-totale (pg/mL)	12	33,1	16,5	49,85	11	64,6	27,1	42,04
AUC0-24 (ore*pg/mL)	12	476,7	115,2	24,16	11	752,2	238,9	31,76
AUC24-48 (ore*pg/mL)	12	502,7	135,9	27,04	11	661,0	249,0	37,67
AUC48-72 (ore*pg/mL)	12	476,8	156,8	32,88	11	658,1	252,5	38,36
AUC0-120 (ore*pg/mL)	12	2333	642,1	27,52	11	2933	889,1	30,31
AUC0-t (ore*pg/mL)	12	3778	1260	33,35	11	4436	1204	27,14
Tlast (ore)	12	200,27	37,50	18,73	11	216,00	0,00	0,00
Clast (pg/mL)	12	17,3	3,87	22,37	11	17,2	5,09	29,53

### Conclusione:

Le concentrazioni basali medie di estradiolo erano nell'intervallo da 14,3 pg/mL a 21,7 pg/mL. Dopo la somministrazione di 0,25 g di gel, le concentrazioni di estradiolo sono aumentate leggermente sopra il basale (concentrazione plasmatica media più elevata = 25,6 pg/mL). Dopo la somministrazione di 1,00 g di gel, le concentrazioni di estradiolo sono aumentate approssimativamente da 2 a 3 volte (concentrazione plasmatica media più elevata = 54,3 pg/mL). In generale le concentrazioni di estradiolo sono tornate ai livelli basali approssimativamente 12 ore dopo la dose per 0,25 g di gel; per 1,00 g di gel, le concentrazioni di estradiolo sono tornate ai livelli basali dopo approssimativamente 96 ore. In generale, Tmax di estradiolo dopo 1,00 g era più breve rispetto a quella dopo 0,25 g. Tmax di estradiolo è stata osservata tra approssimativamente 3 ore (0,25 g, terzo intervallo di dosaggio) e 13 ore (0,25 g, primo intervallo di dosaggio) dopo la somministrazione del gel. All'interno di ciascun gruppo di dose, le stime medie di AUC per ciascun intervallo di dosaggio di 24 ore (AUC<sub>0-24</sub>) erano confrontabili, cosa che indica che non c'è stato un accumulo significativo di estradiolo. C'è stato un aumento inferiore a proporzionale dell'esposizione all'estradiolo con un aumento della

dose del gel. L'aumento dell'esposizione sistemica di picco e complessiva all'estradiolo dopo un aumento di quattro volte della dose di gel era di 1,95 volte sulla base di C<sub>max</sub> 0-120 e di 1,26 sulla base di AUC<sub>0-120</sub>. I rapporti (0,25 g : 1.00 g) (intervalli di confidenza del 90%) per C<sub>max</sub>0-120 e AUC<sub>0-120</sub> di estradiolo erano 47,89% (40,17%, 57,10%) e 80,01% (70,45%, 90,88%), rispettivamente.

**Esempio di riferimento 11: Studio di intensificazione della dose in 12 soggetti maschi umani sani**

Lo scopo primario di questa fase 1 dello studio era di confrontare i profili farmacocinetici (PK) di due diverse formulazioni di gel di estradiolo transdermico su volontari maschi sani. Lo scopo secondario di questo studio era quello di valutare l'incidenza e la gravità degli eventi avversi. Si è trattato di uno studio a due trattamenti, in aperto, multidose che è stato eseguito in due parti per valutare la farmacocinetica dell'estradiolo dopo la somministrazione transdermica di due diverse formulazioni su volontari maschi sani. 12 soggetti maschi adulti sani hanno partecipato a 2 periodi di trattamento casualizzati. Durante ciascun periodo di trattamento, sono stati somministrati una volta al giorno sul braccio del soggetto per cinque giorni o 1,25 g di EstroGel® allo 0,06% (gel di

estradiolo) o 1,0 g di un gel di estradiolo allo 0,07% (non secondo l'invenzione, formulazione nella tabella che segue). I soggetti sono stati casualizzati per ricevere ciascun codice di trattamento A o B durante il primo periodo di trattamento e il codice di trattamento opposto durante il secondo periodo di trattamento. I periodi di trattamento 1 e 2 sono stati separati da un periodo di wash out di 3 giorni. I soggetti sono rimasti confinati nel centro di ricerca per prelievi di sangue per almeno 24 ore dopo l'ultima applicazione di gel dello studio in ciascun periodo di trattamento, e sono tornati al centro di ricerca per prelievi di sangue e altre procedure di studio nei giorni 7 e 8.

0,07%	estradiolo
0,3%	etil oleato
0,3%	acido oleico
0,75%	propilen glicole
16,91%	acqua purificata
79,59%	etanolo
2,0%	Carbomer pemulen TR-1
0,07%	carbonato di sodio anidro
0,007%	bicarbonato di sodio anidro

**Codice  
trattamento**

**di Intervento di trattamento**

A:

Farmaco: EstroGel® (0,06%)  
 Dose = 1,25 g × 0,6 mg/g = 0,75 mg di estradiolo  
 Topica, una volta al giorno per cinque giorni

24 ore tra applicazioni di dose  
Sito di applicazione: braccio  
Livello plasmatico bersaglio =  
approssimativamente 80 pg/mL  
B: Farmaco: 0,07% gel di estradiolo  
di prova  
Dose =  $1,0 \text{ g} \times 0,7 \text{ mg/g} = 0,7 \text{ mg}$   
di estradiolo  
Topica, una volta al giorno per  
cinque giorni  
24 ore tra applicazioni di dose  
Sito di applicazione: braccio  
Livello plasmatico bersaglio =  
approssimativamente 80 pg/mL

Durante ciascun periodo di trattamento, sono stati raccolti campioni di sangue per la misurazione dell'estradiolo prima di ciascuna dose e dopo ciascuna dose in momenti selezionati nelle 72 ore dopo la dose. Sono stati ottenuti 102 campioni di sangue (~510 mL di sangue intero) da ciascun soggetto per farmacocinetiche, escludendo le valutazioni di sicurezza di controllo e dopo il trattamento. Durante i periodi 1 e 2, tutti i campioni di sangue sono stati raccolti dal braccio controlaterale a quello sul quale viene somministrato il gel dello studio, per impedire la contaminazione del campione. Prima di procedere con il periodo di trattamento successivo, dati di sicurezza (eventi avversi, prove cliniche di laboratorio) saranno revisionati prima di iniziare il dosaggio. Per tutti i periodi di trattamento, è stato richiesto ai soggetti di fare doccia/bagno approssimativamente 1 ora prima di ciascuna

applicazione del gel dello studio. I privilegi di doccia/bagno sono stati sospesi fino a 1 ora prima dell'applicazione successiva del gel dello studio. Ciascuna dose è stata applicata per via topica nel sito di applicazione designato. Dopo il dosaggio, non è stato concesso cibo fino a due ore dopo la dose. L'acqua è stata negata per un'ora dopo la dose e quindi concessa ad lib per la parte rimanente del periodo di confinamento. I pasti sono stati serviti ai soggetti approssimativamente alla stessa ora rispetto alla dose per ciascun periodo di trattamento; durante tutti i periodi di trattamento sono state disponibili le stesse scelte di menu. I privilegi relativi a bagno/servizi sono stati sospesi per un'ora dopo il dosaggio.

#### Risultati:

Nella tabella di seguito è fornito un sommario dei parametri farmacocinetici per l'estradiolo dopo l'applicazione topica del gel di prova a 0,7 mg QD x 5 giorni e EstroGel 0,75 mg QD x 5 giorni su volontari maschi sani.

	Gel di prova	EstroGel
Estradiolo *	(0,7 mg QD x 5 giorni)	(0,75 mg QD x 5 giorni)
Cmax (pg/mL)†	65,0 ± 19,4 (10)	55,6 ± 18,2 (10)
Tmax (ore)†	74,0 (10)	85,5 (10)
	[8,0 - 98,0]	[2,0 - 112]
AUC(0-t) (ore×pg/mL)‡	4.131 ± 1.194 (10)	4.043 ± 654 (10)

\* Media aritmetica ± deviazione standard (N) eccetto Tmax per la quale è riportata la mediana (N) [Intervallo].

† Cmax e Tmax assolute per tutte le dosi.

‡ AUC dalla prima all'ultima dose.

Entrambi l'esempio 10 e 11, in cui i gel descritti nella presente sono stati testati in studi clinici su umani, hanno dimostrato che le formulazioni sono sicure ed efficaci nel trasportare il farmaco di interesse sistematicamente nei pazienti.

#### RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica a rilascio prolungato per la somministrazione topica su una superficie cutanea comprendente:

- un agente farmaceuticamente attivo comprendente uno o più steroidi;
- dallo 0,01% al 5% in peso del peso totale della composizione farmaceutica di un estere di acido grasso;
- acqua;
- un monoalcol C2-C6;
- un acido grasso; e
- dallo 0,05% al 5% in peso di un agente gelificante, in cui il rapporto peso : peso dell'estere di acido grasso nella composizione rispetto all'agente attivo complessivo in detta composizione è almeno 4:1 estere di acido grasso : agente attivo, preferibilmente nell'intervallo da 4:1 a 20:1.

2. Composizione secondo la rivendicazione 1, comprendente inoltre un co-solvente, preferibilmente propilene glicole.

3. Composizione secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui le composizioni farmaceutiche è presente in una quantità nell'intervallo dallo 0,01% al 7% in peso del peso totale della composizione farmaceutica, preferibilmente dal 3% al 7% in peso.

4. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui l'estere di acido grasso è selezionato dal gruppo costituito da etil oleato, isopropil oleato, isopropil miristato, isopropil isostearato, isopropil palmitato, etil ottanoato, etil dodecanoato, etil linoleato, etil palmitoleato, etil isostearato ed etil linolenato.

5. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui l'estere di acido grasso è isopropil miristato.

6. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui l'estere di acido grasso è etil oleato.

7. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui l'estere di acido grasso è l'estere che risulterebbe dalla reazione dell'acido grasso formulato nella composizione con un

alcol.

8. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui l'estere di acido grasso non è l'estere che risulterebbe dalla reazione dell'acido grasso formulato nella composizione con l'alcol formulato nella composizione.

9. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui l'estere di acido grasso è presente in una quantità nell'intervallo dallo 0,01% al 5% in peso del peso totale della composizione farmaceutica, preferibilmente dallo 0,05% al 2,4% in peso e più preferibilmente dallo 0,1% al 2,2% in peso.

10. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui l'acido grasso è un acido grasso C8-C22, preferibilmente selezionato dal gruppo costituito da acido caprico, acido laurico, acido miristico, acido palmitico, acido stearico, acido oleico, acido isostearico, acido palmitoleico, acido linoleico e acido linolenico, e più preferibilmente l'acido grasso è acido oleico.

11. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, in cui l'acido grasso è presente in una quantità nell'intervallo dallo 0,01% al 5% in peso del peso totale della composizione

farmaceutica, preferibilmente dallo 0,05% al 3,5% in peso e più preferibilmente dall'1,0% al 3,0% in peso.

12. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4 e da 6 a 11, comprendente lo 0,3% di etil oleato come estere di acido grasso, lo 0,3% di acido oleico come acido grasso e lo 0,75% di propilene glicole come co-solvente, tutti in peso rispetto al peso totale della composizione farmaceutica.

13. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui l'agente farmaceuticamente attivo è selezionato da uno o più tra estradiolo e progesterone, e l'estere di acido grasso è etil oleato.

14. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui l'agente farmaceuticamente attivo è selezionato da uno o più tra testosterone e diidrotosterone (DHT), e l'estere di acido grasso è selezionato tra etil oleato e isopropil miristato.

15. Composizione secondo la rivendicazione 14, in cui l'agente farmaceuticamente attivo è diidrotosterone (DHT)

16. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 15, in cui l'agente attivo è

presente in una quantità di almeno lo 0,01% in peso del peso totale della composizione farmaceutica.

17. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 16, in cui il monoalcool C2-C6 è selezionato dal gruppo costituito da etanolo, n-propanolo, isopropanolo, n-butanolo, isobutanolo, terz-butanolo e relative miscele, preferibilmente il monoalcool C2-C6 è etanolo.

18. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 17, in cui il monoalcool C2-C6 è presente in una quantità nell'intervallo dal 10% al 90% in peso del peso totale della composizione farmaceutica, preferibilmente dal 20% all'80% in peso e più preferibilmente dal 45% al 75% in peso.

19. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, per l'uso in un metodo terapeutico di trattamento di un soggetto, detto metodo comprendendo fornire il rilascio prolungato di un agente farmaceuticamente attivo attraverso la pelle di un soggetto somministrando per via topica la composizione nella pelle del soggetto.

Didascalia delle figure

FIG. 1

Commerciale; Flusso; Campione in tempo intermedio; La quantità di progesterone rilasciata attraverso la pelle in 48 ore per le diverse formulazioni testate nell'esempio 5.

FIG. 2

Estradiolo rilasciato in 48 ore; Concentrazione di estradiolo; La quantità di estradiolo rilasciata attraverso la pelle in 48 ore rispetto al carico di farmaco nella formulazione dell'invenzione (rombi) al confronto con Estrogel® indicato con i quadrati.

FIG. 3

Attivo penetrato; Propilene glicole; Acido oleico; Estradiolo; Effetto di concentrazioni di acido oleico, propilene glicole ed estradiolo sulla penetrazione totale di estradiolo in 48 ore.

FIG. 4

Attivo penetrato; Estradiolo; Propilene glicole; Acido oleico; Effetto della concentrazione di acido oleico, propilene glicole ed estradiolo sulla penetrazione totale di estradiolo in 48 ore.

FIG. 5, 6

Attivo penetrato; Etil oleato; Estradiolo; Effetto

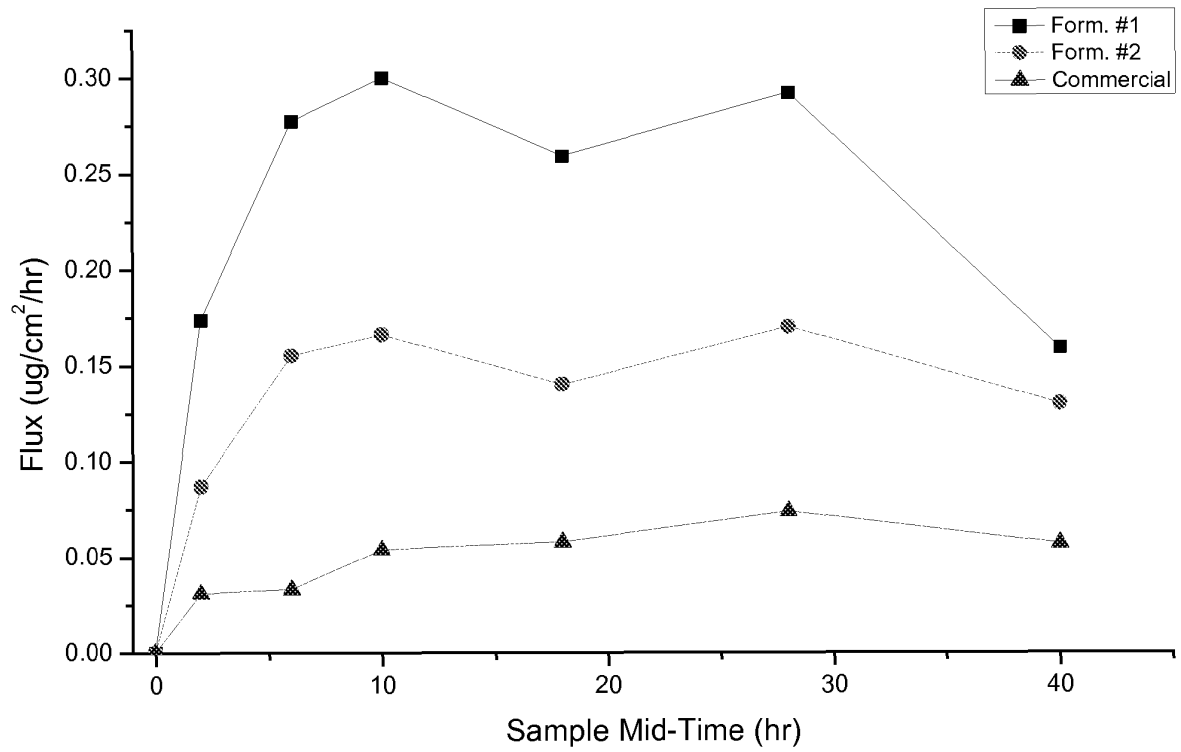
della concentrazione di etil oleato ed estradiolo sulla penetrazione totale di estradiolo in 48 ore.

FIG. 7, 8, 9

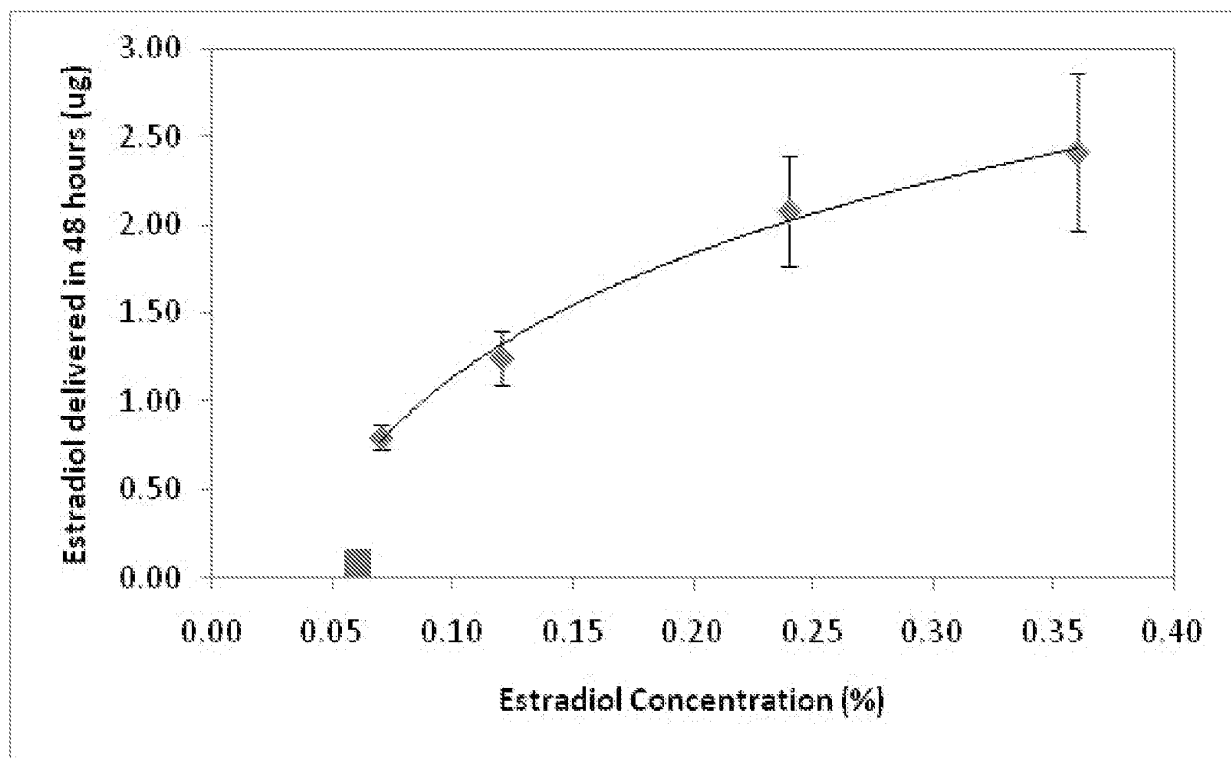
Flusso; Tempo (ore); Profilo di tempo/flusso per ... punti di dati sperimentali.

FIG. 10

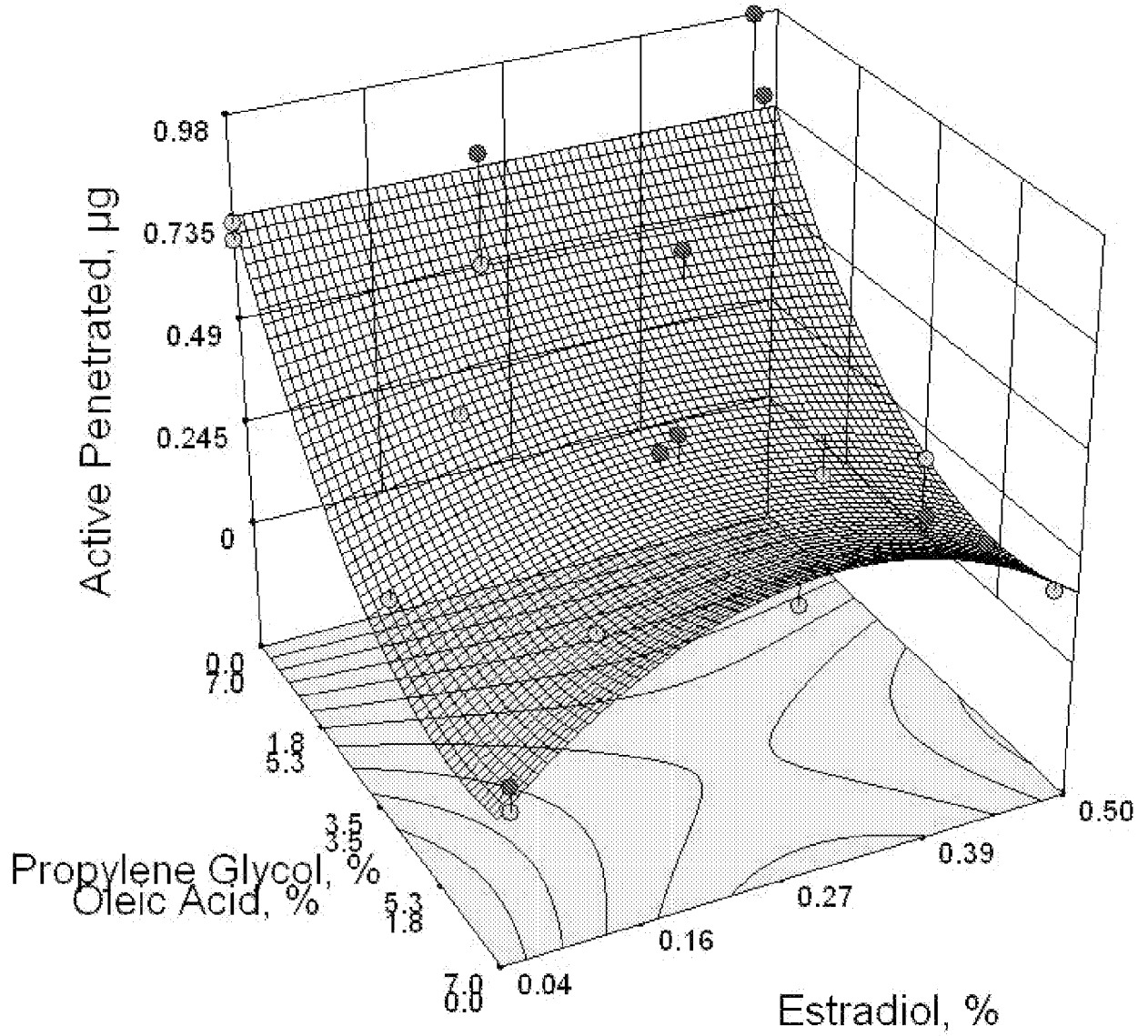
Quantità di etil oleato solubilizzata in ...; Concentrazione di ... nella miscela; Solubilità di etil oleato in funzione della concentrazione di etanolo in una miscela contenente estradiolo, propilene glicole ed acido oleico.



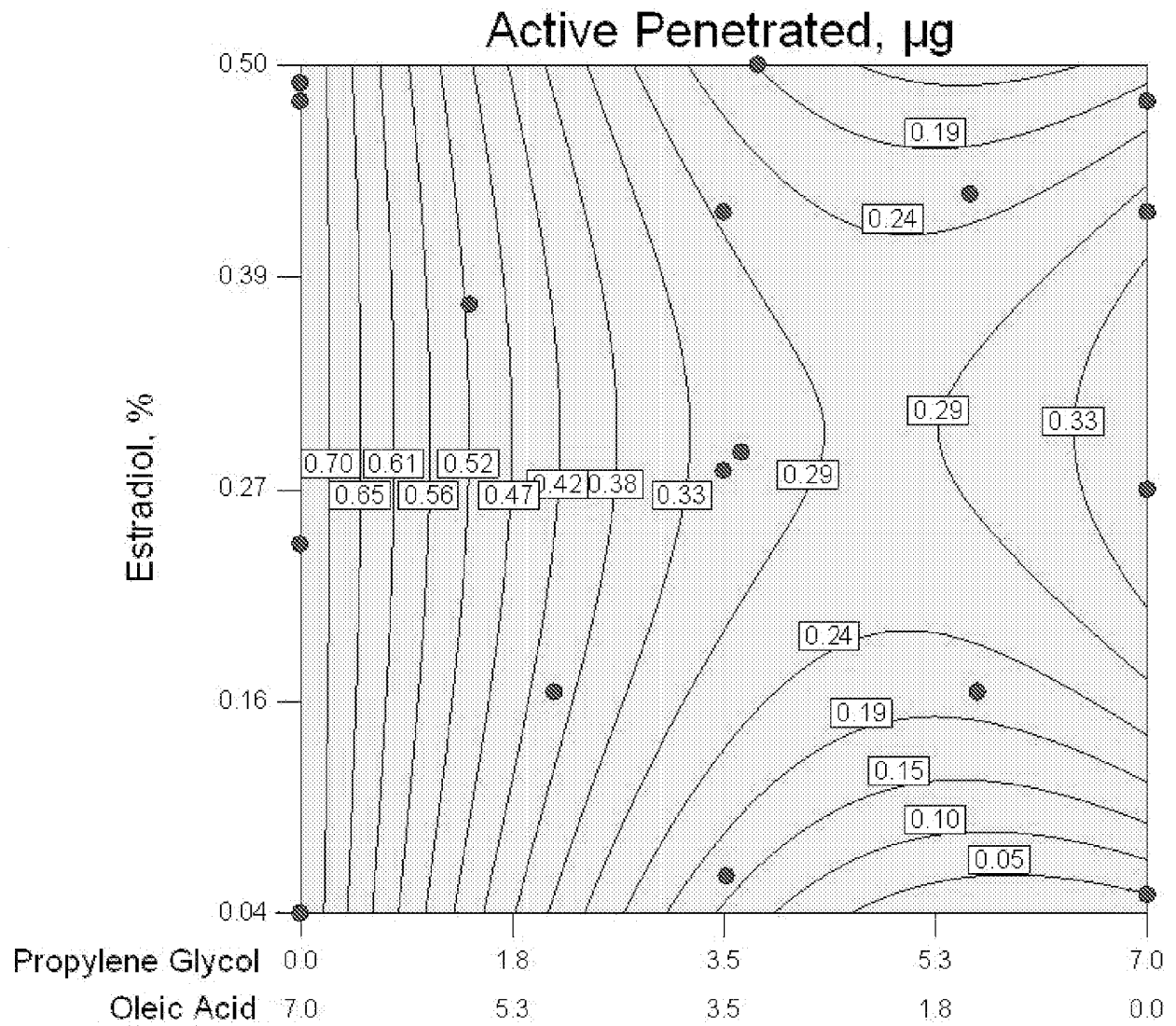
**Figure 1. The amount of progesterone delivered through the skin in 48 hours for the different formulations tested in Example 5.**



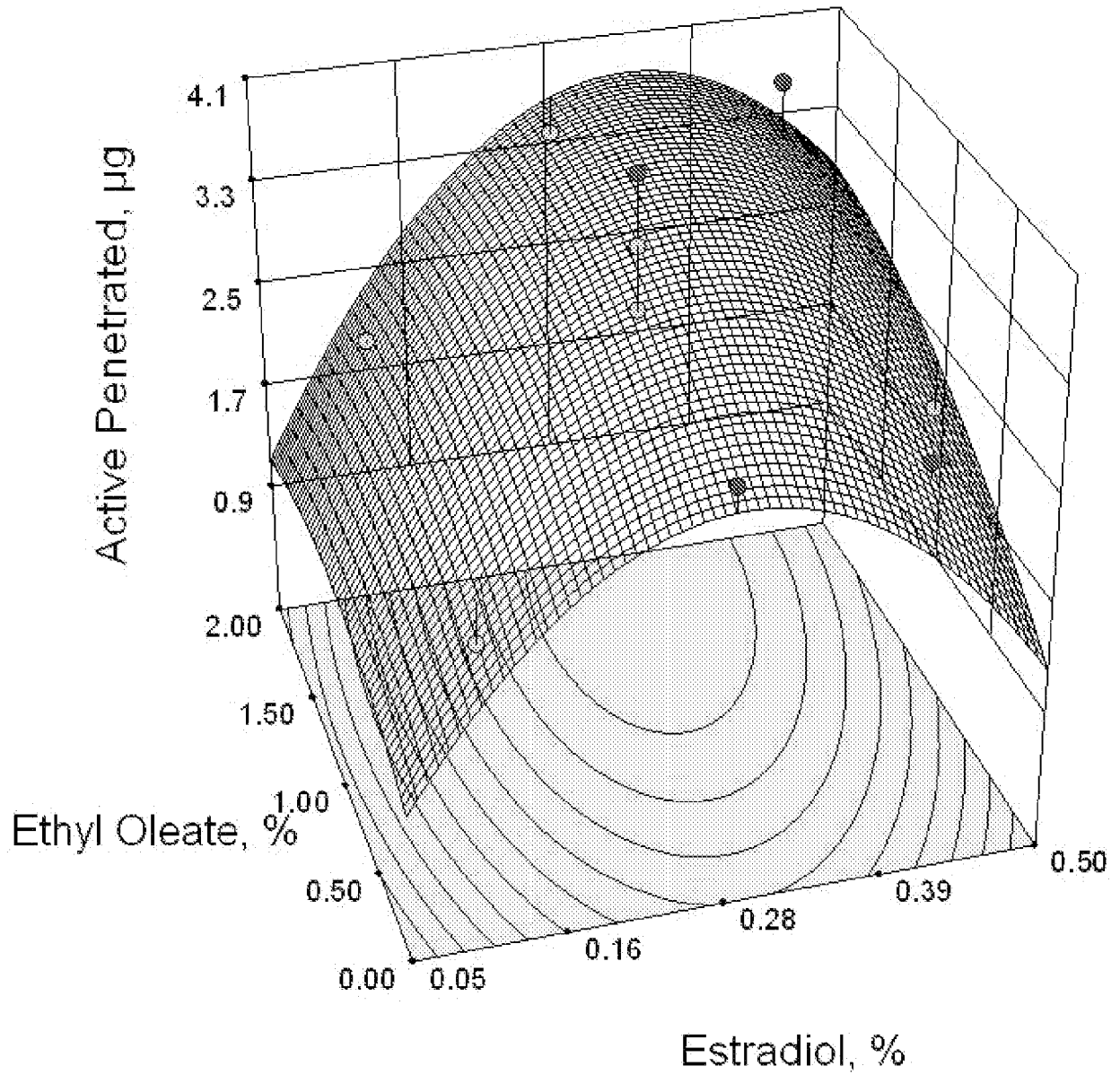
**Figure 2.** The amount of estradiol delivered through the skin in 48 hours relative to the drug loading in the formulation of the invention (diamonds) in comparison with EstroGel<sup>®</sup> (0.06%) shown as a square.



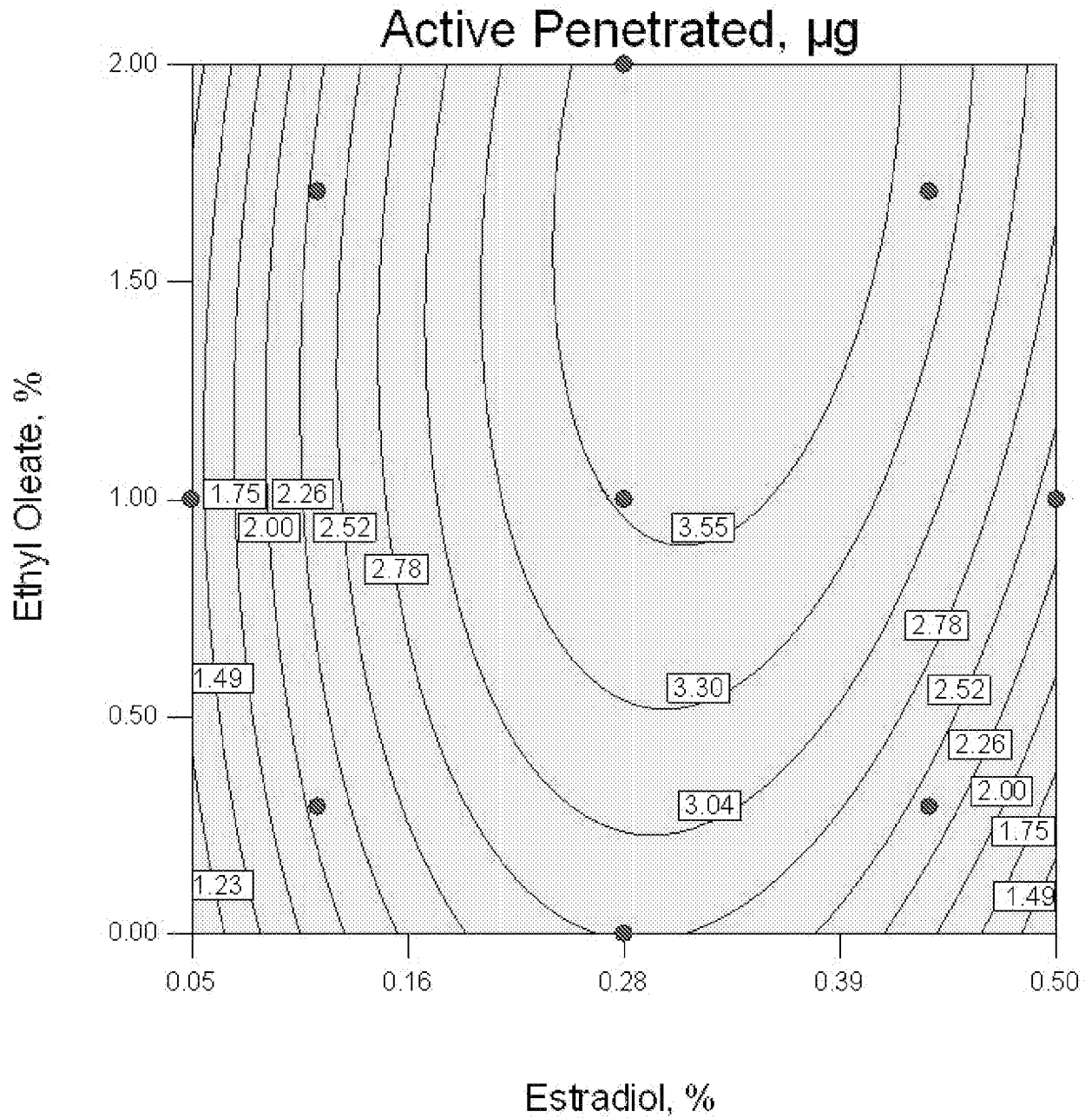
**Figure 3.** Effect of the Oleic Acid, Propylene Glycol and Estradiol concentration on the total penetration of Estradiol over 48 hours.



**Figure 4. Effect of the Oleic Acid, Propylene Glycol and Estradiol concentration on the total penetration of Estradiol over 48 hours.**



**Figure 5. Effect of the Ethyl Oleate and Estradiol concentration on the total penetration of Estradiol over 48 hours.**



**Figure 6. Effect of the Ethyl Oleate and Estradiol concentration on the total penetration of Estradiol over 48 hours.**

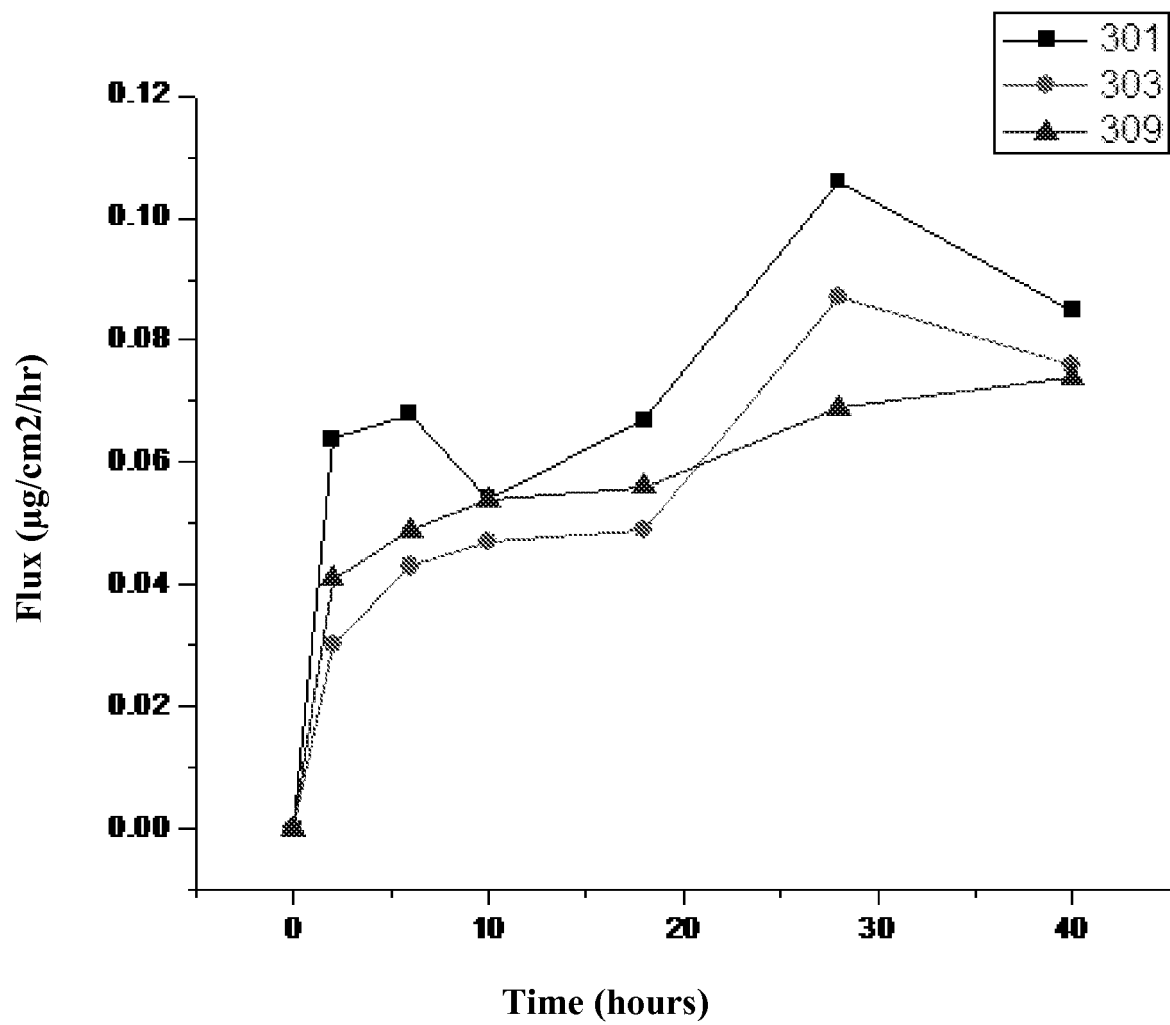


Figure 7. Time/Flux profile for 3 experimental data points.

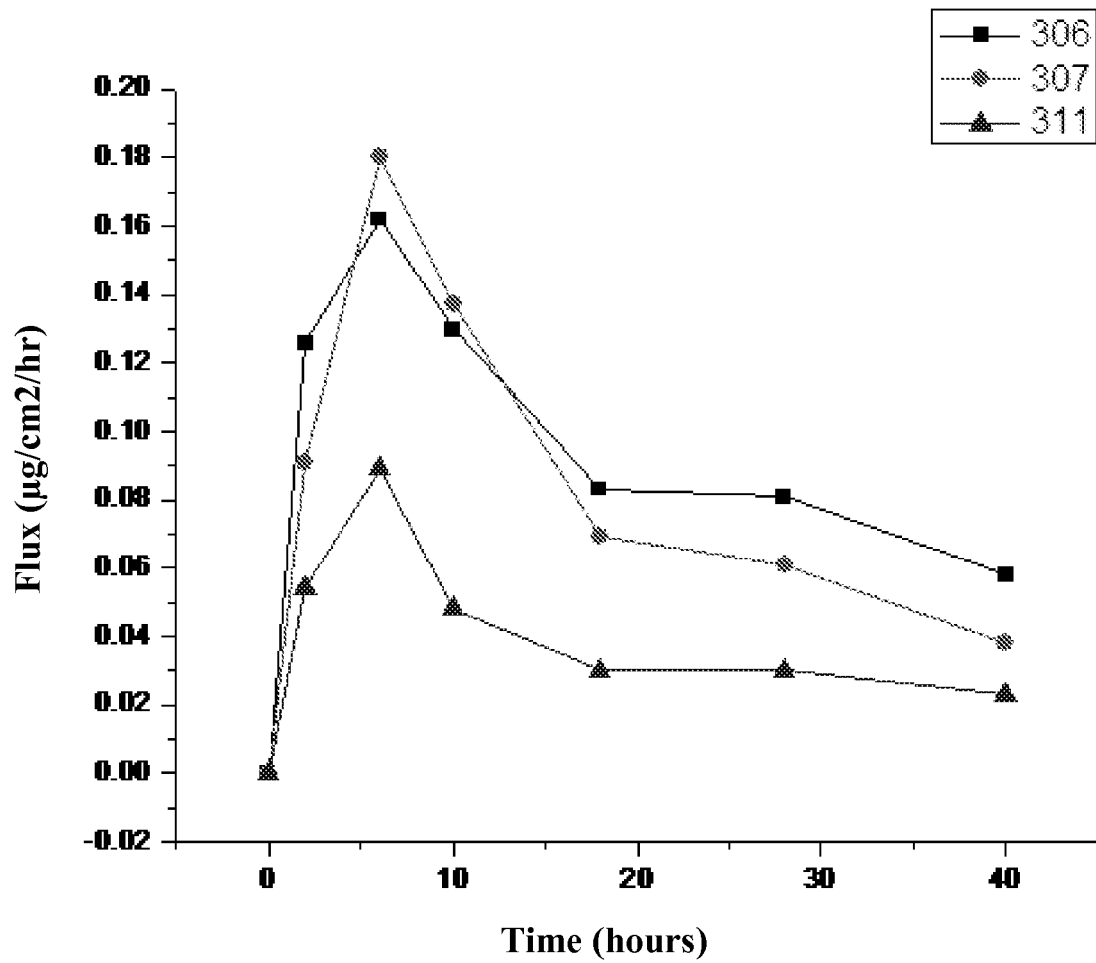


Figure 8. Time/Flux profile for 3 experimental data points.

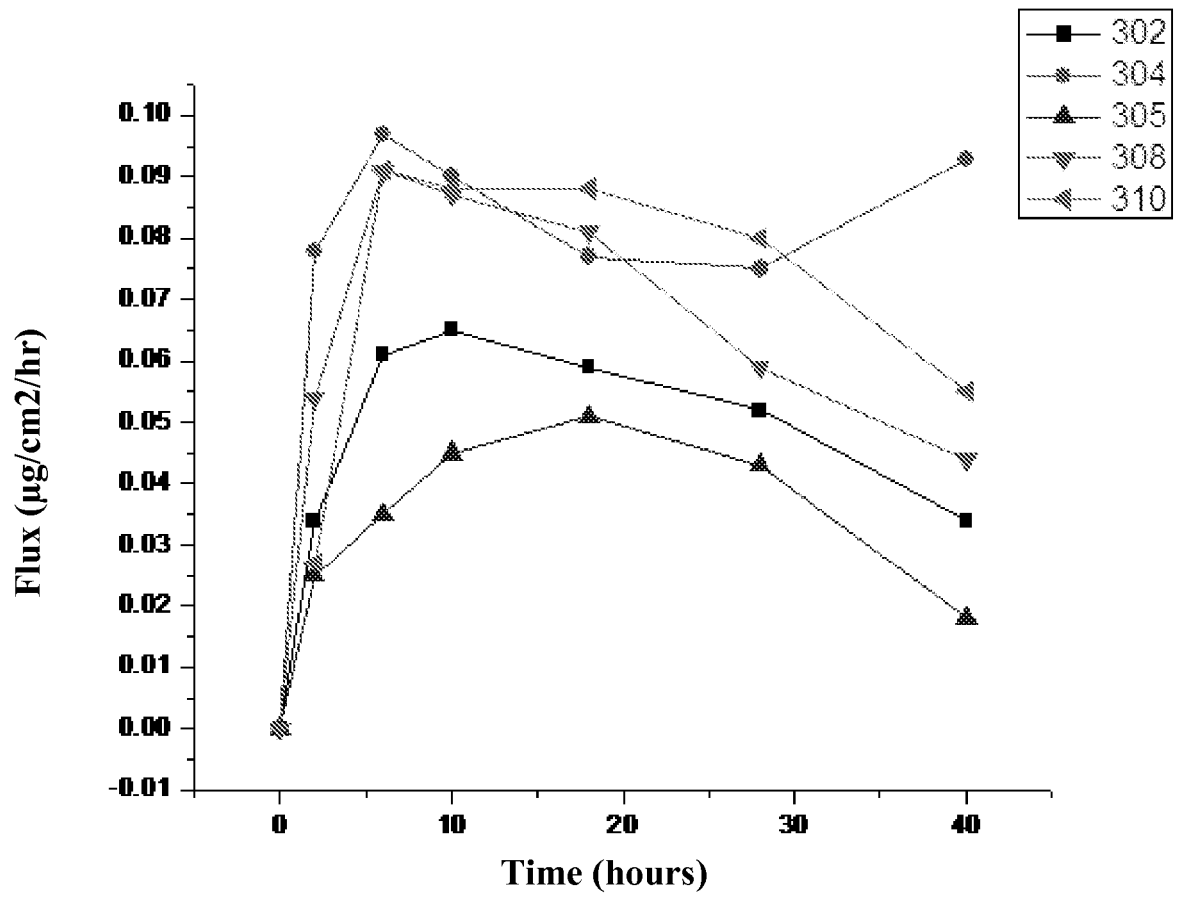
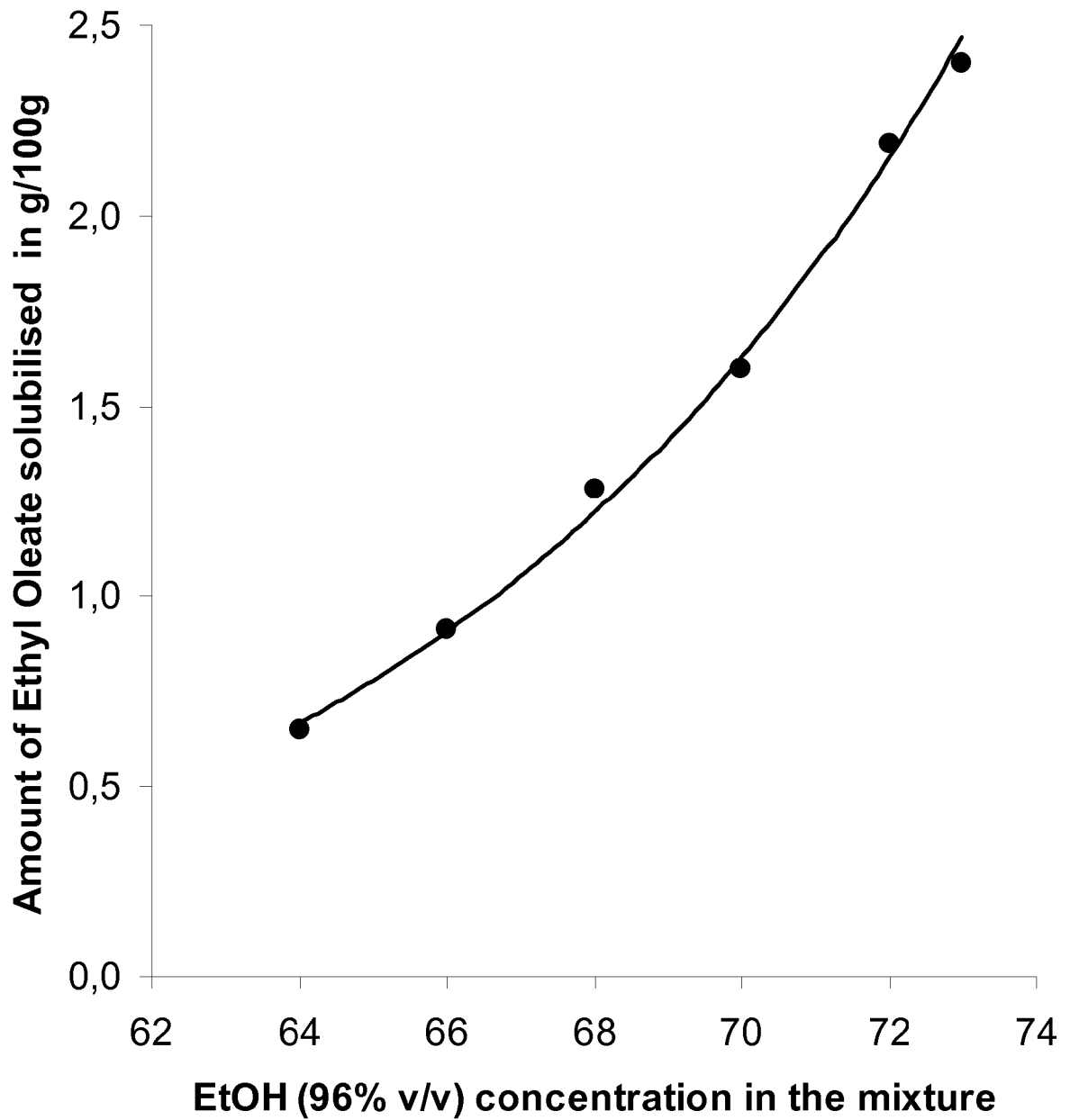


Figure 9. Time/Flux profile for 5 experimental data points.



**Figure 10. Ethyl Oleate solubility as a function of Ethanol concentration in a mixture containing 0.24% Estradiol, 5% propylene glycol and 2% oleic acid.**