

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491389 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.07.23

(51) Int. Cl. *A61Q 7/02* (2006.01)  
*A61K 8/63* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.11.29

---

(54) КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ СТИМУЛИРОВАНИЯ РОСТА ВОЛОС

---

(31) 21211057.1

(32) 2021.11.29

(33) EP

(86) PCT/EP2022/083612

(87) WO 2023/094690 2023.06.01

(71) Заявитель:  
ЭСТЕТРА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:

Герард Селин, Дион Валери (BE)

(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Христофоров  
А.А., Угрюмов В.М., Тихонина О.В.,  
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Джермакян Р.В.  
(RU)

---

(57) Настоящее изобретение относится к композициям для предотвращения выпадения волос и/или стимулирования роста волос, к косметическому или терапевтическому лечению, при котором применяют такие композиции, и к соответствующим составам или единицам дозирования, содержащим такие композиции.

A1

202491389

202491389

A1

# **КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ СТИМУЛИРОВАНИЯ РОСТА ВОЛОС**

## **ОПИСАНИЕ**

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

Настоящее изобретение относится к композициям для предотвращения выпадения волос и/или стимулирования роста волос, к косметическому или терапевтическому лечению, при котором применяют такие композиции, и к соответствующим составам или единицам дозирования, содержащим такие композиции.

Как подробно описано далее в настоящем документе, лечение демонстрирует статистически значимую эффективность в сочетании с благоприятным профилем побочных эффектов при сравнении с доступными в настоящее время способами предотвращения выпадения волос или стимулирование роста волос.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

С возрастом скорость роста волос снижается, что сопровождается уменьшением толщины волос. Седые волосы появляются в результате снижения выработки меланина в матрице волоса. Этот эффект усугубляется у женщин в период менопаузы (то есть у женщин в период перименопаузы и постменопаузы) из-за последствий гормонального дисбаланса, что часто приводит к негативному самовосприятию. Изменение гормонального баланса может влиять на состав кожи и функционирование волосяных фолликулов. Кроме того, секрет сальных желез (кожное сало) обеспечивает смягчающие свойства волос и кожи и находится под влиянием гормонов андрогенов. Секретция кожного сала снижается с возрастом и может зависеть от уровней эстрогенов.

Цикл волосяного фолликула характеризуется периодом роста фолликула (анаген), за которым следует период регрессии и ремоделирования (катаген) и, наконец, период покоя (телоген).

Уровни эстрогенов связаны как с ростом волос, так и с выпадением волос. Например, во время беременности уровни эстрогенов у женщин выше нормального, что ускоряет рост волосяных фолликулов и приводит к образованию объемных густых волос. Напротив, когда уровень эстрогенов снижается, например, после беременности или во время и после менопаузы, больше волосяных фолликулов переходят в фазу «отдыха», что приводит к выпадению волос, вызывает истончение и даже появление участков облысения.

Широко изучено местное применение на коже композиций, содержащих эстрогены, такие как эстрадиол (E2) или эстетрол (E4). Можно сослаться, например, на заявку РСТ WO03103685, в которой сообщается о местном применении косметической композиции, содержащей эстетрол. Там было высказано предположение, что к числу эффектов нанесения эстрогена на кожу относится замедление скорости роста волос, что рассматривалось как положительный момент для предотвращения, например, роста волос на лице у женщин в период менопаузы.

В литературе местное применение эстрогенов считается предпочтительным, как, например, сообщено в документе Hye-Sun Oh and Robert C. Smart (PNAS, Vol. 93, pp. 12525-12530, October 1996), в котором заявлено, что в целом трудно разделить действия местных и системных факторов, регулирующих цикл волосяного фолликула. В целом, результаты показывают, что эффекты модуляции роста волос из-за местного применения E2 и ICI-182780, чистого антагониста эстрогеновых рецепторов, происходят скорее локально, чем системно.

Хотя пероральное (системное) введение заместительной гормональной терапии, включая эстрогены, обычно не рассматривается как лучший вариант косметического применения, например, против выпадения/роста волос, это интересный путь, поскольку он позволяет избежать необходимости ежедневного нанесения, например, крема на кожу/кожу головы, что некоторыми субъектами воспринимается как обременительное и/или неприятное. Еще одним преимуществом является то, что при системном применении эстрогенов в определенных дозах можно одновременно облегчать симптомы, связанные с менопаузой. Однако одной из давних задач в отношении этой формы введения является предупреждение побочных эффектов, связанных с таким системным введением или накоплением эстрогенов у субъекта. Например, в заявке РСТ WO03103685 описано преимущество местного нанесения эстрогена для лечения кожи. В то же время, в данном документе утверждается, что симптомы менопаузы следует лечить отдельно путем перорального или подкожного введения. При этом была предложена дозировка была слишком низкой, чтобы подавить симптомы гипоэстрогемии.

С учетом изложенного, сохраняется потребность в разработке новых композиций или составов, которые позволяют преодолеть некоторые из этих выявленных проблем, не увеличивая при этом риск нежелательных явлений, таких как связанные с современными методами лечения, имеющими отношение к эстрогенам.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

Способность волосяного фолликула (hair follicle, HF) постоянно самообновляться и проходить повторяющиеся циклы зависит от реципрокных взаимодействий, которые происходят между его мезенхимальными и эпителиальными компартментами, так называемых эпителиально-мезенхимальных взаимодействий (epithelial-mesenchymal interactions, EMI). Следовательно, успешные стратегии, направленные на содействие регенерации/стимуляции HF, будут работать лучше всего, когда они нацелены на комбинацию соответствующих популяций клеток, а также на их функционирование/передачу сигналов и/или миграцию. Мезенхима HF в основном представлена специализированными клетками дермальной папиллы (dermal papilla, DP), тогда как эпителиальная фракция обычно содержит кератиноциты (keratinocytes, KC), которые могут присутствовать в различных фолликулярных источниках, включая область выступа, внешнюю корневую оболочку (outer root sheath, ORS) или саму волосяную луковицу. Такие эпителиальные клетки могут происходить от эпидермальных KC со стволоподобными характеристиками, либо находящихся в самом волосяном фолликуле, либо присутствующих в коже, которые способны образовывать эпителий HF и создают EMI с клетками DP, поддерживают рост клеток DP, стимулируя образование HF и структур, подобных сальным железам (Abreu et al., 2021, Stem Cell Research & Therapy volume 12, Article number: 62).

В постнатальном периоде волосяные фолликулы подвергаются циклическому росту, состоящему из фазы покоя (телоген), фазы роста (анаген) и фазы регрессии (катаген). Во время катагена эпителиальные клетки (кератиноциты) у основания фолликула подвергаются апоптозу, но клетки DP (фибробласт) остаются интактными и вытягиваются или мигрируют вверх, пока не останавливаются рядом со стволовыми клетками области выступа волосяного фолликула. Эта ситуация продолжается и в фазе телогена (покоя). В анагене клетки у основания волосяного фолликула начинают пролиферировать, что приводит к росту фолликула вниз и окружению DP. Хотя считается, что сами клетки DP (практически) не делятся, количество клеток в DP увеличивается во время анагена, возможно в результате пополнения за счет соседних клеток дермальной оболочки (мезенхимальных клеток - фибробластов). В начале анагена (роста) DP активирует стволовые клетки во вторичном зародыше волоса, что приводит к новому росту фолликулов вниз. Во время катагена (регрессии) волосяной фолликул отделяется от кровоснабжения, и клетки фолликула подвергаются апоптозу.

При таком уровне техники авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что пероральное введение эстетрола в определенном диапазоне дозировок

может быть полезным для предотвращения или восстановления выпадения волос, связанного или вызванного гормональным дисбалансом в период менопаузы, и для усиления роста волос у женщин в период менопаузы (пери- или постменопаузы). Оно приводит к улучшению текстуры волос, качества волос и внешнего вида волос. Более конкретно, оно приводит к улучшению определенных параметров, таких как, но без ограничения, число волос в целевой области (target area hair count, «ТАНС») и толщина волос в целевой области (target area hair width, «ТАНВ»).

Неожиданно было показано, что в коже после перорального введения достигаются клинически значимые концентрации Е4. Более того, Е4, в отличие от Е2, может действовать на эпидермальные кератиноциты, включая, например, клетки области выступа, внешней корневой оболочки (ORS) или волосяной луковицы, на дермальные фибробласты, такие как, например, клетки дермальной папиллы (DP), и на сальные железы. Показано, что эстетрол обладает несколькими эффектами, которые полезны для предотвращения или уменьшения выпадения волос, в диапазоне от влияния на рост, миграцию и эпителиально-мезенхимальное взаимодействие фибробластов и кератиноцитов, до увеличения активации фолликулов и секреции кожного сала. Кроме того, было показано, что эстетрол влияет на уменьшение воспаления кожи, что связано со здоровьем волосяных фолликулов. Это открывает возможности для создания перорального состава или единицы дозирования, которые можно использовать для предотвращения или уменьшения выпадения волос.

Без ограничения какой-либо теорией полагают, что эстетрол (в отличие, например, от эстрадиола), воздействуя на кератиноциты, может стимулировать и/или продлевать анаген и, следовательно, рост волосяных фолликулов, и/или может задерживать начало катагена за счет увеличения пролиферации кератиноцитов и/или уменьшения их апоптоза, тем самым уменьшая выпадение волос. Кроме того, полагают, что эстетрол, воздействуя также на фибробласты (то есть включая клетки DP), улучшает эпителиально-мезенхимальное взаимодействие, что приводит к активным клеткам DP и росту волос.

В следующих пронумерованных абзацах описаны некоторые конкретные варианты осуществления настоящего изобретения.

Аспект 1. Единица дозирования для перорального введения, содержащая эстетрольный компонент в количестве, эквивалентном от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг эстетрола, для применения в предотвращении или лечении выпадения волос, предпочтительно в ежедневном количестве, эквивалентном от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг эстетрола.

Аспект 2. Применение эффективного количества эстетрольного компонента при производстве композиции или лекарственного средства для предотвращения или лечения

выпадения волос, причем эстетрольный компонент применяют в ежедневном количестве, эквивалентном от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг эстетрола.

Аспект 3. Способ предотвращения или лечения выпадения волос, предусматривающий пероральное введение (или пероральный прием) эстетрольного компонента в ежедневном количестве, эквивалентном от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг эстетрола.

Аспект 4. Косметический способ предотвращения или лечения выпадения волос, предусматривающий пероральное введение (или пероральный прием) эстетрольного компонента в ежедневном количестве, эквивалентном от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг эстетрола, предпочтительно предусматривающий пероральное введение композиции, содержащей от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг эстетрольного компонента.

Аспект 5. Единица дозирования для перорального введения для применения в соответствии с аспектом 1, применение в соответствии с аспектом 2, способ предотвращения или лечения в соответствии с аспектом 3 или способ в соответствии с аспектом 4, причем упомянутое предотвращение или лечение предусматривает или приводит к улучшению текстуры, качества и внешнего вида волос, причем, предпочтительно, упомянутое предотвращение или лечение предусматривает или приводит к улучшению числа волос в целевой области (ТАНС) и/или толщины волос в целевой области (ТАНВ).

Аспект 6. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-5, причем упомянутое выпадение волос представляет собой гормонально обусловленное выпадение волос, более предпочтительно выпадение волос, вызванное менопаузальным нарушением гормональной регуляции, таким как истощение эстрогенов.

Аспект 7. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-6, причем выпадение волос вызвано нарушением состояния волос у женщины в период постменопаузы.

Аспект 8. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-7, причем упомянутое выпадение волос представляет собой выпадение волос по женскому типу или женскую андрогенетическую алопецию (androgenetic alopecia, AGA) (то есть выпадение волос по женскому типу).

Аспект 9. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-8, причем упомянутое

предотвращение или лечение включает в себя предотвращение выпадения волос, обращение вспять выпадения волос, замедление выпадения волос, уменьшение выпадения волос, усиление роста волос или приводит к улучшению текстуры, качества и/или внешнего вида волос.

Аспект 10. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-9, причем упомянутое предотвращение или лечение увеличивает функцию и/или рост кератиноцитов и, в связи с этим, увеличивает функцию и/или рост, предпочтительно, эпидермальных кератиноцитов (КС), таких как находящиеся в области выступа, внешней корневой оболочке (ORS) или волосяной луковице.

Аспект 11. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-10, причем упомянутое предотвращение или лечение увеличивает функцию и/или рост мезенхимальных фибробластов волосяного фолликула и, в связи с этим, увеличивает функцию и/или рост клеток дермальной папиллы (DP) (то есть дифференцированной индуцирующей волосы специализированной формы фибробластов).

Аспект 12. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-11, причем упомянутое предотвращение или лечение подразумевает задержку начала катагена или предотвращение катагена.

Аспект 13. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-12, причем упомянутое предотвращение или лечение подразумевает стимулирование и/или продление анагена.

Аспект 14. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-13, причем упомянутое предотвращение или лечение подразумевает восстановление и/или стимулирование эпителиально-мезенхимального взаимодействия между клетками волосяного фолликула.

Аспект 15. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-14, причем упомянутое предотвращение или лечение характеризуется уменьшением воспаления и/или окислительного стресса в волосяных фолликулах.

Аспект 16. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-15, причем вводят ежедневное количество, эквивалентное от приблизительно 14 мг до приблизительно 21 мг

эстетрола, предпочтительно количество от приблизительно 14 мг до приблизительно 16 мг или от приблизительно 19 мг до приблизительно 21 мг эстетрола.

Аспект 17. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-16, причем упомянутый эстетрольный компонент представляет собой эстетрол или его сложный эфир.

Аспект 18. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-17, причем упомянутый эстетрольный компонент представляет собой моногидрат эстетрола.

Аспект 19. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-18, причем прогестаген не содержится в упомянутой единице дозирования, или причем прогестаген не используют или не вводят совместно.

Аспект 20. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-19, причем прогестаген присутствует в единице дозирования для перорального введения, или причем прогестаген используют, совместно вводят или вводят после лечения с помощью эстетрола.

Аспект 21. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с аспектом 20, причем упомянутый прогестаген выбирают из группы, содержащей: прогестерон, дроспиренон, норэтистерон, норэтистерона ацетат (NETA), норэтиндрон, дидрогестерон, левоноргестрел (LNG), этоноргестрел, норгестрел, номегестрол, номегестрола ацетат (NOMAC), тримегестон, несторон, дидрогестерон, гестоден, дезогестрел, норгестимат, ципротерона ацетат, диеногест и хлормадион. Согласно предпочтительному варианту осуществления упомянутый прогестаген выбирают из группы, содержащей дроспиренон, прогестерон или дидрогестерон.

Аспект 22. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с аспектами 20 или 21, причем упомянутый прогестаген присутствует в упомянутой единице дозирования для перорального введения в количестве, эквивалентном от приблизительно 0,25 мг до приблизительно 4 мг, таком как от приблизительно 1 мг до приблизительно 4 мг, более предпочтительно от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг, от приблизительно 2,5 мг до 3,5 мг дроспиренона, или причем упомянутый прогестаген вводят в количестве, эквивалентном от приблизительно 2,5 мг до 3,5 мг дроспиренона. Согласно предпочтительному варианту осуществления упомянутый прогестаген представляет собой дроспиренон.

Аспект 23. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с аспектами 20 или 21, причем упомянутый прогестаген присутствует в упомянутой единице дозирования для перорального введения в количестве, эквивалентном от приблизительно 1 мг до 20 мг прогестерона, или причем упомянутый прогестаген вводят в количестве, эквивалентном от приблизительно 5 мг до 10 мг прогестерона. Согласно предпочтительному варианту осуществления упомянутый прогестаген представляет собой прогестерон.

Аспект 24. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с аспектами 20 или 21, причем упомянутый прогестаген присутствует в упомянутой единице дозирования для перорального введения в количестве, эквивалентном от приблизительно 25 мг до 300 мг дидрогестерона, или причем упомянутый прогестаген вводят в количестве, эквивалентном от приблизительно 100 мг до 200 мг дидрогестерона. Согласно предпочтительному варианту осуществления упомянутый прогестаген представляет собой дидрогестерон.

Аспект 25. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 1-24, причем дополнительный активный ингредиент, подходящий для предотвращения или лечения выпадения волос, присутствует в единице дозирования для перорального введения, или причем дополнительный активный ингредиент, подходящий для предотвращения или лечения выпадения волос, совместно вводят или вводят до или после лечения с помощью эстетрола.

Аспект 26. Единица дозирования для перорального введения для применения или способ в соответствии с любым из аспектов 1-25, причем композицию составляют для перорального, сублингвального, буккального или сублабиального введения.

Аспект 27. Единица дозирования для перорального введения для применения или способ в соответствии с любым из аспектов 1-26, причем единицу дозирования для перорального введения составляют так, чтобы она соответствовала единице дозирования для ежедневного введения, или, соответственно, вводят как единицу дозирования для ежедневного введения.

Аспект 28. В любом из аспектов, определенных в настоящем документе, упомянутая лекарственная форма может быть представлена в виде составного набора, содержащего упаковочную единицу, например блистерную упаковку, содержащую единицы дозирования для ежедневного перорального применения, содержащие эстетрольный компонент. Специалисту в данной области техники дополнительно будет известно, что в пределах объема настоящего изобретения каждая упаковочная единица, например блистерная упаковка, может быть пронумерована или маркирована иным образом. В

пределах объема настоящего изобретения каждая упаковочная единица может представлять собой запечатанную блистерную упаковку с подложкой из гофрокартона, картона, фольги и пластика, заключенную в подходящую оболочку.

Также предусмотрены такие упаковочные единицы, как бутылки. Материал бутылки специально не ограничен. Согласно предпочтительным вариантам осуществления бутылка представляет собой стеклянную бутылку, характеризующуюся цветом, позволяющим уменьшать или предотвращать разрушение содержимого бутылки под действием, например, ультрафиолетового света, сохраняя при этом степень прозрачности, которая обеспечивает возможность визуального осмотра содержимого упомянутой бутылки. К подходящим цветам относятся без ограничения янтарный, кобальтовый или винтажный зеленый.

Аспект 29. Согласно конкретному варианту осуществления составного набора в соответствии с аспектом 28 упаковочная единица содержит 28 контейнеров или несколько раз по 28 контейнеров, например от 2 до 12 раз по 28 контейнеров.

Вышеупомянутые аспекты дополнительно описаны в следующих разделах и в прилагаемой формуле изобретения. Предмет прилагаемой формулы изобретения настоящим конкретно включен в данное описание.

### **Краткое описание фигур**

**Фигура 1.** Процент бесклеточной области, покрытой нормальными эпидермальными кератиноцитами человека (Normal Human Epidermal Keratinocytes, NHEK) после разного времени контакта с эстетролом (E4), примененным в четырех концентрациях, в присутствии ингибитора пролиферации митомицина С (ММС). Результаты выражены в процентах покрытия бесклеточной области относительно момента времени 0 ч. (среднее +/- стандартные отклонения для трех независимых культур). Для сравнения эффектов обработки с 0,1% этанолом + ММС проводили t-тест Стьюдента. Р-значения  $0,01 < p < 0,05$  считаются значимыми,  $0,001 < p < 0,01$  высокозначимыми и  $p < 0,001$  очень высокозначимыми. Условия слева: покрытие бесклеточной области после 6 часов контакта. Условия справа: покрытие бесклеточной области после 24 часов контакта. Для каждой временной точки слева направо: контроль EtOH (CTL) + ММС; E4  $10^{-7}$  М + ММС; E4  $10^{-8}$  М + ММС; E4  $10^{-9}$  М + ММС; E4  $10^{-10}$  М + ММС.

**Фигура 2.** Процент покрытия бесклеточной области нормальными эпидермальными кератиноцитами человека (NHEK) после разного времени контакта с эстетролом (E4), примененным в четырех концентрациях, в отсутствие ингибитора пролиферации митомицина С (ММС). Результаты выражены в процентах покрытия бесклеточной области относительно момента времени 0 ч. (среднее +/- стандартные отклонения для трех

независимых культур). Для сравнения эффектов обработки с 0,1% этанолом проводили t-тест Стьюдента. Р-значения  $0,01 < p < 0,05$  считаются значимыми,  $0,001 < p < 0,01$  высокосignificantными и  $p < 0,001$  очень высокосignificantными. Условия слева: покрытие бесклеточной области после 6 часов контакта. Условия справа: покрытие бесклеточной области после 24 часов контакта. Для каждой временной точки слева направо: контроль EtOH (CTL);  $E4 \cdot 10^{-7}$  М;  $E4 \cdot 10^{-8}$  М;  $E4 \cdot 10^{-9}$  М;  $E4 \cdot 10^{-10}$  М.

**Фигура 3.** Процент покрытия бесклеточной области нормальными эпидермальными кератиноцитами человека (NHEK) после разного времени контакта с бета-эстрадиолом (E2), примененным в четырех концентрациях, в присутствии ингибитора пролиферации митомицина С (ММС). Результаты выражены в процентах покрытия бесклеточной области относительно момента времени 0 ч. (среднее +/- стандартные отклонения для трех независимых культур). Для сравнения эффектов обработки с 0,1% этанолом + ММС проводили t-тест Стьюдента. Р-значения  $0,01 < p < 0,05$  считаются значимыми,  $0,001 < p < 0,01$  высокосignificantными и  $p < 0,001$  очень высокосignificantными. Условия слева: покрытие бесклеточной области после 6 часов контакта. Условия справа: покрытие бесклеточной области после 24 часов контакта. Для каждой временной точки слева направо: контроль EtOH (CTL) + ММС;  $E2 \cdot 10^{-7}$  М + ММС;  $E2 \cdot 10^{-8}$  М + ММС;  $E2 \cdot 10^{-9}$  М + ММС;  $E2 \cdot 10^{-10}$  М + ММС.

**Фигура 4.** Процент покрытия бесклеточной области нормальными эпидермальными кератиноцитами человека (NHEK) после разного времени контакта с бета-эстрадиолом (E2), примененным в четырех концентрациях, в отсутствие ингибитора пролиферации митомицина С (ММС). Результаты выражены в процентах покрытия бесклеточной области относительно момента времени 0 ч. (среднее +/- стандартные отклонения для трех независимых культур). Для сравнения эффектов обработки с 0,1% этанолом проводили t-тест Стьюдента. Р-значения  $0,01 < p < 0,05$  считаются значимыми,  $0,001 < p < 0,01$  высокосignificantными и  $p < 0,001$  очень высокосignificantными. Условия слева: покрытие бесклеточной области после 6 часов контакта. Условия справа: покрытие бесклеточной области после 24 часов контакта. Для каждой временной точки слева направо: контроль EtOH (CTL);  $E2 \cdot 10^{-7}$  М;  $E2 \cdot 10^{-8}$  М;  $E2 \cdot 10^{-9}$  М;  $E2 \cdot 10^{-10}$  М.

**Фигура 5.** Процент покрытия бесклеточной области нормальными дермальными фибробластами человека (Normal Human Dermal Fibroblasts, NHDF) после разного времени контакта с эстетролом (E4), примененным в четырех концентрациях, в присутствии ингибитора пролиферации митомицина С (ММС). Результаты выражены в процентах покрытия бесклеточной области относительно момента времени 0 ч. (среднее +/- стандартные отклонения для трех независимых культур). Для сравнения эффектов

обработки с 0,1% этанолом + ММС проводили t-тест Стьюдента. Р-значения  $0,01 < p < 0,05$  считаются значимыми,  $0,001 < p < 0,01$  высокозначимыми и  $p < 0,001$  очень высокозначимыми. Условия слева: покрытие бесклеточной области после 6 часов контакта. Условия справа: покрытие бесклеточной области после 24 часов контакта. Для каждой временной точки слева направо: контроль EtOH (CTL) + ММС;  $E4 \cdot 10^{-7}$  М + ММС;  $E4 \cdot 10^{-8}$  М + ММС;  $E4 \cdot 10^{-9}$  М + ММС;  $E4 \cdot 10^{-10}$  М + ММС.

**Фигура 6.** Процент покрытия бесклеточной области нормальными дермальными фибробластами человека (NHDF) после разного времени контакта с эстетролом (E4), примененным в четырех концентрациях, в отсутствие ингибитора пролиферации митомицина С (ММС). Результаты выражены в процентах покрытия бесклеточной области относительно момента времени 0 ч. (среднее +/- стандартные отклонения для трех независимых культур). Для сравнения эффектов обработки с 0,1% этанолом проводили t-тест Стьюдента. Р-значения  $0,01 < p < 0,05$  считаются значимыми,  $0,001 < p < 0,01$  высокозначимыми и  $p < 0,001$  очень высокозначимыми. Условия слева: покрытие бесклеточной области после 6 часов контакта. Условия справа: покрытие бесклеточной области после 24 часов контакта. Для каждой временной точки слева направо: контроль EtOH (CTL);  $E4 \cdot 10^{-7}$  М;  $E4 \cdot 10^{-8}$  М;  $E4 \cdot 10^{-9}$  М;  $E4 \cdot 10^{-10}$  М.

**Фигура 7.** Процент покрытия бесклеточной области нормальными дермальными фибробластами человека (NHDF) после разного времени контакта с бета-эстрадиолом (E2), примененным в четырех концентрациях, в присутствии ингибитора пролиферации митомицина С (ММС). Результаты выражены в процентах покрытия бесклеточной области относительно момента времени 0 ч. (среднее +/- стандартные отклонения для трех независимых культур). Для сравнения эффектов обработки с 0,1% этанолом + ММС проводили t-тест Стьюдента. Р-значения  $0,01 < p < 0,05$  считаются значимыми,  $0,001 < p < 0,01$  высокозначимыми и  $p < 0,001$  очень высокозначимыми. Условия слева: покрытие бесклеточной области после 6 часов контакта. Условия справа: покрытие бесклеточной области после 24 часов контакта. Для каждой временной точки слева направо: контроль EtOH (CTL) + ММС;  $E2 \cdot 10^{-7}$  М + ММС;  $E2 \cdot 10^{-8}$  М + ММС;  $E2 \cdot 10^{-9}$  М + ММС;  $E2 \cdot 10^{-10}$  М + ММС.

**Фигура 8.** Процент покрытия бесклеточной области нормальными дермальными фибробластами человека (NHDF) после разного времени контакта с бета-эстрадиолом (E2), примененным в четырех концентрациях, в отсутствие ингибитора пролиферации митомицина С (ММС). Результаты выражены в процентах покрытия бесклеточной области относительно момента времени 0 ч. (среднее +/- стандартные отклонения для трех независимых культур). Для сравнения эффектов обработки с 0,1% этанолом проводили t-

тест Стьюдента. Р-значения  $0,01 < p < 0,05$  считаются значимыми,  $0,001 < p < 0,01$  высокозначимыми и  $p < 0,001$  очень высокозначимыми. Условия слева: покрытие бесклеточной области после 6 часов контакта. Условия справа: покрытие бесклеточной области после 24 часов контакта. Для каждой временной точки слева направо: контроль EtOH (CTL); E2  $10^{-7}$  М; E2  $10^{-8}$  М; E2  $10^{-9}$  М; E2  $10^{-10}$  М.

**Фигура 9.** Влияние эстрогенов на миграцию фибробластов в анализе методом застания царапины. Пилотные эксперименты показывают, что E4 так же эффективен, как и E2 в стимулировании миграции фибробластов как в мышинных (А), так и в человеческих (В) фибробластах. Верхние панели показывают репрезентативные изображения закрытия раны в присутствии носителя, E2 ( $10^{-7}$ М) или E4 ( $10^{-7}$ М), нижние панели показывают процент закрытия раны в присутствии носителя, E2 или E4. E2  $10^{-7}$ М и E4  $10^{-7}$ М тестировали в мышинных фибробластах (А), пять доз тестировали как для E2, так и для E4 в человеческих фибробластах (В) с постепенным увеличением от  $10^{-10}$  М (слева) до  $10^{-6}$  М (справа). Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM (Standard Error Of Mean, стандартная ошибка среднего) для трех независимых культур от разных доноров. \*:  $p < 0,05$ .

**Фигура 10.** Влияние эстрогенов на миграцию кератиноцитов в анализе методом застания царапины. В условиях культивирования с добавлением 15% добавки для роста кератиноцитов человека (Human Keratinocyte Growth Supplement, HKGS) воздействие E4 ( $10^{-10}$  М и  $10^{-7}$  М) на кератиноциты кажется более сильным, чем воздействие E2. Ось X: различные условия тестов (все концентрации выражены в М). Ось Y: процент закрытия раны. Пунктирная линия: базальный уровень миграции кератиноцитов, наблюдаемый для контрольных условий (крайние слева условия;  $10^{-7}$  М этанола).

**Фигура 11.** Влияние эстрогенов на поляризацию иммунных клеток. Результаты выражены как относительная экспрессия провоспалительного маркера, характерного для подтипа M1, в (А) активированных человеческих моноцитах, обработанных отрицательным контролем (M1 Veh), эстрадиолом (M1 E2) или эстетролом (M1 E4), и в (В) неактивированных мышинных моноцитах костномозгового происхождения (bone marrow derived monocytes, BMDM), обработанных отрицательным контролем (M0 Veh), или активированных мышинных BMDM, обработанных отрицательным контролем (M1 Veh), эстрадиолом (M1 E2) или эстетролом (M1 E4). Введение E4 приводит к переключению с подтипа моноцитов M1 (провоспалительный) на подтип M2 (заживляющий).

**Фигура 12.** Дизайн эксперимента для примера 6. Микродиссекционированные человеческие HF в анагене фазы VI из FUE культивировали при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  с 5%  $\text{CO}_2$  в минимальной среде Уильямса E (Gibco, Life Technologies), дополненной 2 мМ L-глутамина (Gibco), 10 нг/мл гидрокортизона (Sigma Aldrich), 10 мкг/мл инсулина (Sigma Aldrich) и 1

смесью пенициллина/стрептомицина (Gibco) для получения полной среды Уильямса (Williams Complete Media, WCM), как описано ранее (Edelkamp et al., *Molecular Dermatology*, 2020 и Langan et al., *Exp Dermatol*, 2015).

**Фигура 13.** Окрашивание Ki-67/TUNEL. gHM: герминативная матрица волоса (germinative hair matrix); pcHM: прекоортальная матрица волоса (precortical hair matrix).

**Фигура 14.** Стадии цикла развития волоса. Два верхних изображения: стадия анагена. Два средних изображения: ранние стадии катагена. DP: дермальная папилла; DPst: стебелек дермальной папиллы (dermal papilla stalk); CTS: соединительнотканная оболочка (connective tissue sheath); gHM: герминативная матрица волоса. Нижнее изображение: репрезентативное изображение дистрофического волосяного фолликула (Keyence VHX900).

**Фигура 15.** Эстетрол не вызывает высвобождение LDH в среду. Среда собрана от  $n=7-8$  HF на группу, культивированных до дня 6 от донора 2 (день 1, день 3, дни 5 и 6); Среднее, GraphPad Prism 9, обобщенный тест Д'Агостино-Пирсона на нормальность распределения. Был применен непараметрический анализ, критерий Краскела-Уоллиса, критерий множественного сравнения Данна с фиксированным носителем, не значимо.

**Фигура 16.** Эстетрол не влияет на выработку стержней волос. Объединенные данные  $n=4$  доноров женского пола, среднее значение  $\pm$  SEM (стандартная ошибка среднего), GraphPad Prism 9. Критерий Краскела-Уоллиса  $p=0,4856$ ; критерий множественного сравнения Данна (с фиксированным носителем) н. з.; критерий Манна-Уитни в сравнении с носителем  $*p<0,05$ . Макроскопическое определение стадий цикла роста волос проводили в соответствии с критериями, опубликованными в документе Langan et al., *Exp Dermatol* 2015. A = анаген; EC = ранний катаген; MC = средний катаген; dys = дистрофический катаген.

**Фигура 17.** Микроскопически все концентрации эстетрола (в частности, 3 мкМ) поддерживают более длинные HF в анагене (A, B). Объединенные данные  $n=4$  доноров женского пола, среднее значение  $\pm$  SEM, GraphPad Prism 9. Критерий Краскела-Уоллиса  $*p=0,0304$ ; критерий множественного сравнения Данна (с фиксированным носителем) н. з.; критерий Манна-Уитни в сравнении с носителем  $*p<0,05$ . (C, D) Микроскопические изображения: DP: дермальная папилла; HMx: матрица волоса (hair matrix); DC: дермальная чаша (dermal cup). Изображенная масштабная полоска соответствует 100 мкм.

**Фигура 18.** Эстетрол (3 мкМ) увеличивает пролиферацию кератиноцитов матрицы волоса, при этом не влияя на апоптоз (A, B). Объединенные данные  $n=4$  доноров женского пола, среднее значение  $\pm$  SEM, GraphPad Prism 9. (A): однофакторный ANOVA  $p=0,2115$ ; критерий множественного сравнения Холма-Сидака с фиксированным носителем н. з.;

Непарный t-критерий Стьюдента в сравнении с носителем  $*p < 0,05$ . (B): критерий Краскела-Уоллиса  $p = 0,6460$ ; критерий множественного сравнения Данна (с фиксированным носителем) н. з.; критерий Манна-Уитни в сравнении с носителем; н. з. (C) Микроскопические изображения: клетки Ki-67+ подсчитывали в областях с обозначенными границами ниже линии Auber (герминативная матрица волоса, gHM), тогда как клетки TUNEL+ подсчитывали в областях с обозначенными границами ниже (gHM) и выше (прекортикальная матрица волоса, pсHM) линии Auber.

**Фигура 19.** Все протестированные концентрации E4 имели тенденцию повышать экспрессию версикана и активность щелочной фосфатазы в клетках дермальной папиллы (DP). Объединенные данные  $n = 4$  доноров женского пола, среднее значение  $\pm$  SEM, GraphPad Prism 9 (A) Экспрессия версикана в дермальной папилле. Критерий Краскела-Уоллиса  $p = 0,3529$ ; критерий множественного сравнения Данна (с фиксированным носителем) н. з.; критерий Манна-Уитни в сравнении с носителем н. з. (B) Активность щелочной фосфатазы в дермальной папилле. Критерий Краскела-Уоллиса  $p = 0,5508$ ; критерий множественного сравнения Данна (с фиксированным носителем) н. з.; критерий Манна-Уитни в сравнении с носителем н. з. (C) Микроскопические изображения. DP= дермальная папилла, изображенная масштабная полоска соответствует 100 мкм.

**Фигура 20.** Анализ эмиграции фибробластов DP показал, что все протестированные концентрации E4 не оказывали заметного влияния на плотность клеток в DP. Объединенные данные  $n = 4$  доноров женского пола, среднее значение  $\pm$  SEM, GraphPad Prism 9. Критерий Краскела-Уоллиса  $p = 0,2081$ , критерий множественного сравнения Данна (с фиксированным носителем) н. з.; критерий Манна-Уитни в сравнении с носителем н. з.

**Фигура 21.** Все концентрации эстетрола имели тенденцию к снижению плотности клеток, а 300 нМ и 3 мкМ E4 значительно снижали общее количество клеток в стебельке DP. Объединенные данные  $n = 4$  доноров женского пола, среднее значение  $\pm$  SEM, GraphPad Prism 9. (A) Плотность клеток стебелька дермальной папиллы. Однофакторный ANOVA  $p = 0,5092$ ; критерий множественного сравнения Холма-Сидака с фиксированным носителем н. з.; непарный t-критерий Стьюдента в сравнении с носителем н. з. (B) Общее количество клеток стебелька дермальной папиллы. Однофакторный ANOVA  $*p = 0,0296$ ; критерий множественного сравнения Холма-Сидака с фиксированным носителем  $*p = 0,0177$ ; непарный t-критерий Стьюдента в сравнении с носителем,  $*p < 0,05$ .

**Фигура 22.** Эстетрол не оказывал значительного влияния на плотность клеток в индуктивной дермальной чаше. Объединенные данные  $n = 4$  доноров женского пола, среднее значение  $\pm$  SEM, GraphPad Prism 9. Однофакторный ANOVA  $p = 0,7616$ ; критерий

множественного сравнения Холма-Сидака с фиксированным носителем н. з.; Непарный t-критерий Стьюдента в сравнении с носителем н. з.

**Фигура 23.** В базальном слое области выступа 3 мкМ E4 значительно снижали процент K15-положительных клеток, тогда как 30 мкМ (значительно), 3 мкМ и 300 нМ (на уровне тенденции) E4 увеличивали их пролиферацию. Объединенные данные n=4 доноров женского пола, среднее значение  $\pm$  SEM, GraphPad Prism 9. (A) Процентная доля клеток K15+ в базальном слое области выступа. Однофакторный ANOVA  $p=0,0641$ ; критерий множественного сравнения Холма-Сидака с фиксированным носителем  $\#p=0,288$ ; непарный t-критерий Стьюдента в сравнении с носителем  $*p<0,05$  (B) Процентная доля клеток Ki-67+ в базальном слое области выступа. Критерий Краскела-Уоллиса  $p=0,1302$ ; критерий множественного сравнения Данна (с фиксированным носителем) н. з.; критерий Манна-Уитни в сравнении с носителем  $**p<0,01$ .

**Фигура 24.** В супрабульбарной ORS эстетрол не оказывал никакого влияния на процентную долю K15-положительных клеток, но 300 нМ (значительно) и 3 мкМ (на уровне тенденции) E4 уменьшали их пролиферацию. Объединенные данные n=4 доноров женского пола, среднее значение  $\pm$  SEM, GraphPad Prism 9. (A) Процентная доля клеток K15+ в супрабульбарном базальном слое. Критерий Краскела-Уоллиса  $p=0,9375$ ; критерий множественного сравнения Данна (с фиксированным носителем) н. з.; критерий Манна-Уитни в сравнении с носителем н. з. (B) Процентная доля клеток Ki-67+ в супрабульбарном базальном слое. Критерий Краскела-Уоллиса  $p=0,7462$ ; критерий множественного сравнения Данна (с фиксированным носителем) н. з.; критерий Манна-Уитни в сравнении с носителем  $*p<0,05$ . (C) Микроскопические изображения. Масштабная полоска = 100 мкм (ORS: внешняя корневая оболочка).

**Фигура 25.** 3 мкМ (значительно) и 300 нМ и 30 мкМ (на уровне тенденции) эстетрола увеличивали процентную долю CD34-положительных клеток в супрабульбарной ORS. (A) Процентная доля клеток CD34+ в базальном слое области выступа. Объединенные данные n=4 доноров женского пола, среднее значение  $\pm$  SEM, GraphPad Prism 9, однофакторный ANOVA  $p=0,1011$ ; критерий множественного сравнения Холма-Сидака с фиксированным носителем  $*p=0,0392$ ; непарный t-критерий Стьюдента в сравнении с носителем  $*p<0,05$ . (B) Микроскопические изображения. Масштабная полоска = 100 мкм (ORS: внешняя корневая оболочка).

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

При использовании в настоящем документе формы единственного числа охватывают как единственное, так и множественное число, если контекст явно не требует иного.

Термины «состоящий», «состоит» и «состоящий из» при использовании в настоящем документе являются синонимами для «включающий в себя», «включает в себя» или «содержащий», «содержит» и являются включающими или открытыми и не исключают дополнительных неперечисленных членов, элементов или стадий способа. Эти термины также охватывают «состоящий из» и «состоящий по существу из», которые имеют устоявшиеся значения в патентной терминологии.

Указание числовых диапазонов по конечным точкам охватывает все числа и дроби, входящие в соответствующие диапазоны, а также указанные конечные точки. Это относится к числовым диапазонам независимо от того, представлены ли они выражением «от... до...», или выражением «между... и...», или другим выражением.

Подразумевается, что термины «примерно» или «приблизительно» при использовании в настоящем документе в отношении измеримой величины, такой как параметр, количество, временная продолжительность и аналогичные величины, охватывают отклонения указанного значения и отклонения от него, такие как отклонения +/-10% или менее, предпочтительно +/-5% или менее, более предпочтительно +/-1% или менее и, еще более предпочтительно, +/-0,1% или менее от указанного значения, насколько такие отклонения являются приемлемыми для реализации раскрытого изобретения. Следует понимать, что значение, к которому относится модификатор «примерно» или «приблизительно», само по себе также конкретно и предпочтительно раскрыто.

Хотя термины «один или несколько» или «по меньшей мере один», например один или несколько членов или по меньшей мере один член группы членов, ясны сами по себе благодаря дополнительным примерам, эти термины охватывают помимо прочего ссылку на любой из упомянутых членов или на любые два или более из упомянутых членов, как например на любые  $\geq 3$ ,  $\geq 4$ ,  $\geq 5$ ,  $\geq 6$  или  $\geq 7$  и так далее из упомянутых членов, и вплоть до всех упомянутых членов. В другом примере «один или несколько» или «по меньшей мере один» могут относиться к 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более.

Рассмотрение предшествующего уровня техники настоящего изобретения включено в настоящий документ для объяснения контекста настоящего изобретения. Это не следует воспринимать как признание того, что любой из упомянутых материалов был опубликован, известен или являлся частью общеизвестных знаний в любой стране на дату приоритета любого из пунктов формулы изобретения.

На протяжении настоящего раскрытия различные публикации, патенты и опубликованные описания патентов даны с помощью идентифицирующей ссылки. Все документы, цитированные в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. В частности, идеи или разделы таких документов, конкретно упомянутые в настоящем документе, включены посредством ссылки.

Если не указано иное, все термины, используемые при раскрытии настоящего изобретения, включая технические и научные термины, имеют значения, обычно понятные рядовому специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В качестве дополнительных указаний определения терминов включены для лучшего понимания идеи настоящего изобретения. Когда конкретные термины определены в связи с конкретным аспектом настоящего изобретения или конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения, такое значение или дополнительное значение подразумевается применимым на протяжении всего настоящего описания, то есть также в контексте других аспектов или вариантов осуществления настоящего изобретения, если не определено иначе. Например, варианты осуществления, относящиеся к продуктам, также применимы к соответствующим признакам способов и применений.

В нижеследующих параграфах различные аспекты или варианты осуществления настоящего изобретения определены более подробно. Каждый аспект или вариант осуществления, определенный таким образом, может быть объединен с любым другим аспектом(ами) или вариантом(ами) осуществления, если явно не указано иное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или выгодный, может быть объединен с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или выгодные.

Ссылка в настоящем описании на «один вариант осуществления», «вариант осуществления» означает, что конкретные признак, структура или характеристика, описанные в связи с данным вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, появление фраз «согласно одному варианту осуществления» или «согласно варианту осуществления» в различных местах настоящего описания не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим способом, ставшим очевидным специалисту в данной области техники из настоящего раскрытия, в одном или нескольких вариантах осуществления. Кроме того, хотя некоторые варианты осуществления, описанные в настоящем документе, включают в себя некоторые, но не другие признаки, включенные в

другие варианты осуществления, подразумевается, что комбинации признаков различных вариантов осуществления находятся в пределах объема настоящего изобретения и образуют разные варианты осуществления, как понятно специалистам в данной области техники. Например, прилагаемая формула изобретения охватывает альтернативные комбинации заявленных вариантов осуществления, как понятно специалистам в данной области техники.

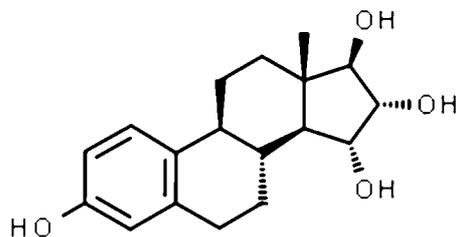
#### Общие определения и контекст настоящего изобретения

Термин «эстетрольный компонент» при использовании в настоящем документе охватывает вещества, выбранные из группы, состоящей из эстетрола, сложных эфиров эстетрола, сложных эфиров эстетрола, в которых атом водорода по меньшей мере одной из гидроксильных групп замещен ацильным радикалом углеводородной карбоновой, сульфоновой кислоты или сульфаминовой кислоты с 1-25 атомами углерода, гидратов эстетрола, таких как моногидрат эстетрола; и их комбинаций. Следует понимать, что когда в любом разделе настоящего описания упомянут эстетрол, также подразумевается любой эстетрол-содержащий компонент (то есть соединение) и/или производное эстетрола (такое как сложный эфир эстетрола). Более предпочтительно, в контексте настоящего раскрытия особенно предпочтительным эстетрольным компонентом, подходящим для единицы дозирования или косметических или медицинских применений и способов лечения, описанных в настоящем документе, является эстетрол (включая гидраты эстетрола). Наиболее предпочтительно, упомянутый эстетрольный компонент представляет собой моногидрат эстетрола.

Термин «эстетрол» при использовании в настоящем документе относится к 1,3,5 (10)-эстратриен-3,15альфа,16альфа,17бета-тетролу или 15альфа-гидроксиэстриолу, а также к гидратам эстетрола, например к моногидрату эстетрола. «Эстетрол», или сокращенно «Е4», представляет собой эстрогеновый стероид, вырабатываемый фетальной печенью человека (PubChem CID: 27125). Эстетрол можно описать как 3-гидроксистероид, соответствующий 17бета-эстрадиолу, в котором положения 15 $\alpha$  и 16 $\alpha$  замещены двумя дополнительными гидроксигруппами. Известно, что эстетрол является агонистом эстрогенового рецептора (Coelingh Bennink et al., Estetrol review: profile and potential clinical applications, Climacteric, 2008). В тех случаях, когда эстетрольный компонент, описанный в настоящем документе, обозначает эстетрол, упомянутый эстетрол может представлять собой эндогенный эстетрол. В качестве альтернативы, эстетрол может быть синтезирован химически, синтезирован с использованием (мутантных) рекомбинантных ферментов или синтезирован с помощью любой их комбинации. Эстетрол альтернативно может

обозначаться в данной области техники с помощью своей молекулярной формулы  $C_{18}H_{24}O_4$  или структурной формулы (I):

**Формула (I)**



Согласно предпочтительному варианту осуществления эстетрол присутствует или используется в настоящем документе в виде моногидрата.

Согласно некоторым вариантам осуществления эстетрольный компонент может быть единственным активным ингредиентом или может быть объединен с любым другим косметическим или фармацевтически активным средством для уменьшения или предотвращения выпадения волос, известным в данной области техники.

Хотя согласно предпочтительному варианту осуществления упомянутый эстетрольный компонент вводят без прогестагенового компонента, согласно некоторым вариантам осуществления, например когда у пациента еще есть матка, необязательный прогестагеновый компонент можно вводить в дополнение к эстетрольному компоненту.

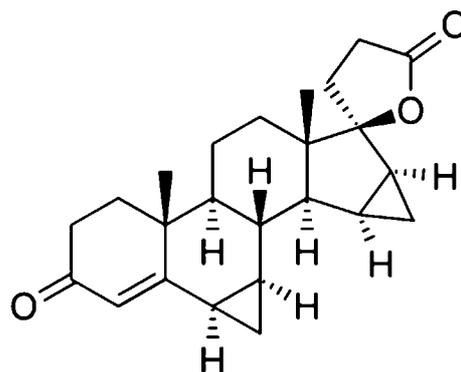
Термины «прогестаген», «прогестаген», «гестаген» или «гестоген» и производное от них «прогестагеновые соединения» при использовании как в настоящем документе, так и в данной области техники относятся к любой молекуле, которая оказывает эффекты, аналогичные эффектам природного женского полового гормона прогестерона в организме субъекта. Прогестагены считаются агонистами прогестероновых рецепторов, и их функции тщательно изучены в данной области техники (в частности, рассмотрены в документе Kuhl, *Pharmacology of estrogens and прогестагены: influence of different routes of administration, Climacteric*, 2005). Прогестины представляют собой подгруппу прогестагенов, которая содержит синтетические прогестагены. Хотя приведенные выше термины можно в данной области техники использовать взаимозаменяемо, существует общее понимание того, что когда упоминается прогестин, имеются в виду синтетические прогестагены.

Примерами прогестинов являются: левоноргестрел, норгестимат, норэтистерон, дидрогестерон, дроспиренон, 3-бета-гидроксидезогестрел, 3-кетодезогестрел, 17-деацетилноргестимат, 19-норпрогестерон, ацетоксипрегненолон, аллилэстренол, амгестон, хлормадион, ципротерон, демегестон, дезогестрел, диеногест, дигидрогестерон, диметистерон, этистерон, этинодиола диацетат, флуорогестона ацетат, гастринон, гестоден, гестринон, гидроксиметилпрогестерон, гидроксипрогестерон, линестренол, мецирогестон,

медроксипрогестерон, мегестрол, меленгестрол, номегестрол, норэтиндрон, норэтинодрел, норгестрел (включая d-норгестрел и dl-норгестрел), норгестриенон, норметистерон, прогестерон, квингестанол, (17 альфа)-17-гидрокси-11-метилен-19-норpregна-4,15-диен-20-ин-3-он, тиболон, тримегестон, альгестон-ацетофенид, несторон, промегестон, сложные эфиры 17-гидроксипрогестерона, 19-нор-17-гидроксипрогестерон, 17альфа-этинилтестостерон, 17альфа-этинил-19-нортестостерон, d-17бета-ацетокси-13бета-этил-17альфа-этинилгон-4-ен-3-он-оксим, ббета,7бета,15бета,16бета-диметилен-3-оксо-17-прегна-4,9(11)-диен-21,17бета-карболактон или танапрогет и предшественники этих соединений, которые способны высвободить эти прогестагены *in vivo*.

Дроспиренон (сокращенно DRSP, PubChem CID: 68873) является примером прогестина и широко используется в комбинированных пероральных контрацептивах (Combined Oral Contraceptives, COC) благодаря своей антиминокортикоидной и антиандрогенной активности в сочетании с общей низкой нецелевой активностью. В целом содержащие дроспиренон COC относят к COC четвертого поколения. В качестве содержащих дроспиренон COC, содержащих дроспиренон, известны «Yaz™» и Yasmin™. Иллюстративным примером содержащей только дроспиренон прогестагеновой таблетки является «Slynd™», которая также коммерчески доступна. Кроме того, доступны композиции HRT, содержащие эстроген, такой как эстрадиол, и дроспиренон, такие как «Angeliq™». Дроспиренон может быть альтернативно обозначен в данной области техники с помощью своей молекулярной формулы C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub> или с помощью структурной формулы (II):

Формула (II)



Следует понимать, что при использовании термина «дроспиренон» в настоящем документе также подразумеваются любые производные дроспиренона.

В качестве иллюстрации, а не ограничения, к другим прогестагенам или прогестинам, которые используют в COC, относятся норэтистерон, норэтиндрон, левеноргестрел (LNG), норгестрел, гестоден, дезогестрел, норгестимат, ципротерона ацетат, диеногест и хлормадион.

В контексте настоящего изобретения можно использовать другие соединения в сочетании с эстетрольным компонентом для введения женщинам, у которых есть матка. Селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (Selective Estrogen Receptor Modulators, SERM) определяют категорию таких соединений, которые рассматриваются в качестве полезных дополнений к эстетрольному компоненту в способах согласно настоящему изобретению. Предпочтительным SERM для применения в контексте настоящего изобретения является базедоксифен.

Следует понимать, что когда в способах и композициях, описанных далее в настоящем документе, делается ссылка на «прогестагеновый компонент», такая ссылка охватывает SERM и, в частности, базедоксифен.

Термин «эффективное количество» относится к количеству, необходимому для получения физиологического эффекта. Физиологический эффект может быть достигнут за счет одной дозы или повторных доз.

Предпочтительными субъектами являются субъекты-люди женского пола.

Согласно определенным вариантам осуществления субъект является субъектом женского пола в период менопаузы, перименопаузы и/или постменопаузы. Согласно определенным вариантам осуществления субъект является субъектом в период менопаузы, перименопаузы или постменопаузы, характеризующимся уровнем эстрадиола менее чем 100 пг/мл, предпочтительно менее чем 50 пг/мл, предпочтительно менее чем 30 пг/мл, более предпочтительно менее чем 20 пг/мл, более предпочтительно менее чем 20 пг/мл, наиболее предпочтительно менее чем 10 пг/мл. Согласно альтернативным вариантам осуществления субъект является субъектом в период менопаузы, перименопаузы или постменопаузы, который характеризуется концентрацией фолликулостимулирующего гормона по меньшей мере 20 миллимеждународных единиц на миллилитр (мМЕ/мл), предпочтительно по меньшей мере 25 мМЕ/мл, более предпочтительно по меньшей мере 30 мМЕ/мл, более предпочтительно по меньшей мере 35 мМЕ/мл, наиболее предпочтительно по меньшей мере 40 мМЕ/мл.

Термин «субъекты в период менопаузы», используемый в данной области техники взаимозаменяемо с терминами «субъекты в период постменопаузы» или «субъекты в климактерическом периоде», обозначает субъектов женского пола, у которых в течение года не было менструальных кровотечений, что сопровождается снижением или прекращением выработки яичниками гормонов (таких как эстрадиол). Другими словами, «менопауза» может быть описана как биологическое состояние, характеризующееся нарушением или прекращением первичной функции яичников. Менопауза может сопровождаться широким спектром клинических симптомов различной степени тяжести,

таких как, но без ограничения, вазомоторная дисфункция, сухость влагалища, изменения настроения, нарушения сна, недержание мочи, когнитивные изменения, соматические жалобы и сексуальная дисфункция. Методики диагностики менопаузы описаны в данной области техники и поэтому известны специалисту в данной области техники (Nelson, Menopause, Lancet, 2008).

Термин «перименопауза» относится к периоду жизни, который начинается примерно за три-четыре года до менопаузы и заканчивается через год после периода последней менструации и характеризуется стойкими нерегулярными менструальными циклами, резкими колебаниями гормонального фона, частой ановуляцией и появлением вазомоторных симптомов (Harlow et al., Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging, Menopause, 2012). Термин «постменопауза» или «постменопаузальный» указывает на субъектов женского пола, для которых характерно окончательное прекращение менструальных периодов. Это окончательное прекращение определяется ретроспективно после наблюдения аменореи в течение 12 месяцев без какой-либо другой очевидной патологической или физиологической причины. Термин «постменопауза» также охватывает менопаузу как следствие преждевременной недостаточности яичников, хирургического вмешательства (например, овариэктомии), химиотерапии или лучевой терапии рака и некоторых заболеваний (например, инфекций или гипотиреоза).

Термин «выпадение волос» при использовании в настоящем документе соответствует выпадению волос, возникающему в результате снижения уровней эстрогенов у субъекта, обычно после менопаузального перехода. Этот термин соответствует выпадению волос по женскому типу и женской андрогенной алопеции в целом. Оно может происходить из-за естественных событий менопаузы или из-за раннего удаления матки или любого другого синдрома или расстройства, приводящего к гипоестрогенному состоянию. Хотя очевидно, что вышеизложенное применимо только к субъектам женского пола, алопеция может также возникать у субъектов мужского пола, когда уровни эстрогенов, в первую очередь в результате конверсии тестостерона, оказываются ниже нормальных уровней.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что эстетрол оказывает положительное влияние на пролиферацию и функционирование кератиноцитов.

Термин «кератиноциты» охватывает тип клеток, обнаруженных в эпидермисе и в эпителиальных клетках волосяного фолликула, включая кератиноциты области выступа, кератиноциты внешней корневой оболочки (ORS) и кератиноциты волосяной луковицы. Во внешнем слое кожи кератиноциты составляют приблизительно 90% клеток.

Подразумевается, что термин «повышение функции кератиноцитов» охватывает как повышение пролиферации кератиноцитов в эпидермисе и волосяных фолликулах, так и увеличение, улучшение или восстановление функции кератиноцитов в эпидермисе и волосяных фолликулах. Упомянутая функция включает в себя, но без ограничения, увеличение толщины и гидратации кожи, обеспечение адекватного кожного барьера и обеспечение надлежащего заживления ран, стимулирование роста клеток волосяного фолликула во время анагена и эпителиально-мезенхимальное взаимодействие, то есть взаимодействие с мезенхимальными клетками, такими как фибробласты волосяного фолликула, включая клетки дермальной папиллы.

Кератиноциты также играют роль в окислении и воспалении. Увеличение выработки ROS (генерируемых, среди прочего, в кератиноцитах) и окислительный стресс увеличивают повреждение ДНК, белков и липидов и могут приводить к преждевременному старению кожи и выпадению волос. Хроническое воспаление низкой степени тяжести повреждает кожу за счет увеличения экспрессии провоспалительных цитокинов кератиноцитами, что приводит пагубным изменениям и преждевременному старению кожи и выпадению волос.

Кроме того, на пигментацию кожи влияют кератиноциты, а также меланоциты, основной функцией которых является выработка пигмента меланина, окружены кератиноцитами, которым они передают свой пигмент меланин. Из-за тесного взаимодействия и связи между меланоцитами и кератиноцитами отдельный меланоцит может быть окружен 36 кератиноцитами, воздействуя на кератиноциты, например, с помощью эстетрола, также воздействует на меланоциты и, следовательно, пигментацию. Термин «меланин», при использовании в настоящем раскрытии относится к группе природных пигментов, продуцируемых меланоцитами, локализованными в эпидермисе. В данной области техники были описаны различные типы меланина (например, в документе Wei et al., *Unravelling the structure and function of melanin through synthesis*, J Am Chem Soc, 2021). Термин «меланогенез» обычно используется в данной области техники и относится к процессу выработки меланина. Меланогенез, например, повышающе регулируется при воздействии на кожу ультрафиолетового излучения, что приводит к потемнению тона кожи.

Термин «активные формы кислорода», обычно сокращенно «ROS», является общим термином для молекул, образованных из кислорода ( $O_2$ ). Иллюстративными примерами служат пероксиды, супероксиды, гидроксильные радикалы, синглетные формы кислорода и альфа-формы кислорода. Активные формы кислорода, среди прочего, производятся в фибробластах и кератиноцитах. И дерма, и эпидермис могут защищать кожу от окисления, тогда как эпидермис содержит самую высокую концентрацию антиоксидантов. ROS является негативным или усугубляющим фактором в отношении выпадения волос по

женскому типу из-за повреждения, причиняемого волосяным фолликулам. Следовательно, снижение ROS важно для предотвращения выпадения волос по женскому типу.

Кератиноциты также являются важным типом клеток, способствующим заживлению ран, поскольку они отвечают за закрытие раны и реэпителизацию, а также за модуляцию воспаления в ране наряду с иммунными клетками. Дисбаланс функции кератиноцитов может приводить к несбалансированному воспалению.

Выражения, относящиеся к «воспалению кожи» или «кожному воспалению», используемые в настоящем документе, следует интерпретировать в соответствии с общепринятым значением в уровне техники, и они, таким образом, указывают на любой местный иммунный ответ кожи. Причины воспаления кожи конкретно не ограничены в контексте настоящего изобретения и включают, например, патогены, дисфункцию иммунной системы, аллергические реакции и раны. Таким образом, воспаление кожи можно рассматривать как результат клеточных взаимодействий в коже субъекта, причем иммунные клетки остаются наиболее важным типом клеток.

Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что эстетрол также положительно влияет на пролиферацию и функционирование фибробластов.

Термин «фибробласты» охватывает тип клеток, обнаруженных в дерме и в мезенхимальных клетках волосяного фолликула, включая клетки дермальной папиллы. К таким фибробластам также относятся клетки дермальной папиллы в волосяном фолликуле, которые, хотя и практически не пролиферируют, увеличиваются в количестве за счет взаимодействий с окружающими кератиноцитами благодаря эпителиально-мезенхимальным взаимодействиям (EMI).

Дермальные фибробласты являются основным типом клеток, присутствующим в соединительной ткани кожи (дерме). Фибробласты взаимодействуют с эпителиальными клетками во время развития волос (EMI) и в межфолликулярной коже, играют важную роль в заживлении кожных ран и, как известно, выполняют различные функции в поддержании хорошего здоровья кожи, в частности, в поддержании толщины кожи, содержания коллагена и эластичности кожи и в поддержании хорошего баланса содержания/потери воды в коже. Фибробласты взаимодействуют с эпидермальными клетками во время развития волос и в межфолликулярной коже.

Термин «кожное сало» при использовании в настоящем документе относится к маслянистому и/или воскообразному веществу, которое продуцируется в сальных железах себоцитами, причем последние представляют собой высокоспециализированные эпителиальные клетки, которые секретируют кожное сало посредством голокриновой секреции. Кожное сало представляет собой композицию, содержащую триглицериды,

сложные эфиры воска, сквален и свободные жирные кислоты, и образует неотъемлемый компонент эпидермального барьера и иммунной системы кожи. Сальные железы развиваются из той же ткани, которая дает начало эпидермису, и могут быть разделены на сальные железы, связанные с волосяными фолликулами, и самостоятельно существующие сальные железы. Секрет сальных желез (кожное сало) обеспечивает смягчающие свойства волос и кожи и находится под влиянием гормонов андрогенов. Секрция кожного сала снижается с возрастом и может зависеть от уровней эстрогенов.

#### Терапия против выпадения волос и улучшение текстуры волос, качества волос и внешнего вида волос

Настоящее изобретение согласно одному аспекту относится к композиции, содержащей эстетрольный компонент, для применения в предотвращении или лечении выпадения волос, как определено в другом месте в настоящем документе. Другими словами, настоящее изобретение предусматривает применение композиции, содержащей эстетрольный компонент, для предотвращения или лечения выпадения волос и улучшения текстуры, качества и внешнего вида волос. В другой формулировке настоящее изобретение предусматривает применение эстетрольного компонента (или композиции, содержащей эстетрольный компонент) для производства лекарственного средства для предотвращения или лечения выпадения волос. Наконец, настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения для предотвращения или уменьшения выпадения волос, предусматривающему введение композиции, предусматривающей системное введение эстетрольного компонента субъекту. В данной области техники описаны многочисленные методы и подходы к измерению и/или мониторингу выпадения волос (обзор приведен, например, в документе Dhurat and Saraogi, Int J Trichology, 2009), например число волос в целевой области («ТАНС») и толщина волос в целевой области («ТАНВ»). Термины «ширина волос в целевой области» и «толщина волос в целевой области» можно взаимозаменяемо использовать в настоящем документе и во всем уровне техники.

Термин «выпадение волос» при использовании в настоящем документе относится к любому виду выпадения волос у субъекта, предпочтительно взрослого субъекта, более предпочтительно взрослого субъекта женского пола. Термин «выпадение волос» при использовании в настоящем документе в широком смысле относится к любому виду алопеции. Таким образом, термин «выпадение волос» при использовании в настоящем документе охватывает клинические состояния, более известные как андрогенетическая алопеция (AGA) или гнездная алопеция, фиброзирующая алопеция, диффузная алопеция, рубцовая алопеция и генерализованная алопеция. Следовательно, единицу дозирования для

применения, применение или способ, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения алопеции, в частности андрогенетической алопеции. Андрогенетическая алопеция неоднократно подробно описана в данной области техники (например, в документе Chin et al., *Androgenetic alopecia*, StatPearls, 2022) и поэтому известна специалисту в данной области техники. Андрогенетическая алопеция (взаимозаменяемо обозначаемая термином «тип выпадения волос») представляет собой состояние выпадения волос, которое в основном поражает верхнюю и переднюю часть кожи головы. Выпадение волос по мужскому типу обычно описывают как залысины на передней линии волос, выпадение волос на верхней части кожи головы или их комбинацию. Выпадение волос по женскому типу обычно характеризуется диффузным истончением волос по всей коже головы. Согласно предпочтительным вариантам осуществления единицу дозирования для применения, применение или способ, описанные в настоящем документе, применяют для лечения выпадения волос по женскому типу.

Термины «лечение» или «лечить» следует интерпретировать как терапевтическое лечение уже развившегося симптома, заболевания или состояния, приводящего к (клиническим) проявлениям, а также как профилактические или превентивные меры, причем целью лечения является предотвращение, уменьшение или снижение вероятности возникновения нежелательного заболевания, например предотвращение возникновения, развития и прогрессирования симптомов, (клинических) состояний или заболеваний, связанных с выпадением волос. Таким образом, дополнительный аспект настоящего изобретения направлен на эффективное количество эстетического компонента для применения в предотвращении выпадения волос у субъекта, предпочтительно субъекта в период менопаузы. К полезным или желаемым клиническим результатам могут относиться, без ограничения, облегчение одного или нескольких симптомов, улучшение одного или нескольких биологических маркеров, уменьшение степени заболевания, стабилизация (то есть отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержка или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение состояния заболевания и аналогичные результаты.

«Предотвращение» или «предотвращать» при использовании в контексте настоящего изобретения относится к предупреждению проявления картины состояния или заболевания у субъекта, то есть к установлению превентивных мер или профилактических мер. Превентивное лечение относится к лечению, целью которого является предотвращение проявления (ухудшения) симптомов нежелательного физиологического изменения в организме субъекта или его элементе.

При использовании в настоящем документе термины «терапевтическое лечение» или «терапия» и аналогичные относятся к лечению, целью которого является изменение организма субъекта или части организма субъекта от нежелательного физиологического состояния, заболевания или расстройства, вызванного старением, до желаемого состояния, такого как менее тяжелое состояние (например, улучшение), или даже до нормального, здорового состояния (например, восстановление здоровья, физической целостности и физического благополучия субъекта), его поддержание (то есть отсутствие его ухудшения) в упомянутом нежелательном физиологическом состоянии (например, стабилизация) или замедление прогрессирования до более тяжелого или худшего состояния по сравнению с упомянутым нежелательным физиологическим изменением или расстройством. К измеримому уменьшению относится любое статистически значимое снижение измеримого маркера или симптома. Термин «статистически значимый» при использовании в настоящем документе относится к р-значениям ниже 0,05, что, как понятно специалисту в данной области техники, является общепринятым пороговым показателем в статистическом анализе. Термин «лечение» охватывает как радикальное лечение, так и лечение, направленное на уменьшение симптомов, и/или замедление прогрессирования, и/или стабилизацию состояния или заболевания.

Специалисту в данной области техники известно, что для достижения эффективного терапевтического лечения необходимо вводить упомянутому субъекту терапевтически эффективную дозу. Следовательно, в контексте настоящего раскрытия термин «эффективное количество» относится к количеству, необходимому для получения физиологического эффекта. Физиологический эффект может быть достигнут за счет однократной дозы или за счет нескольких доз. Термины «терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» означают количество эстетрольного компонента, которое при введении вызывает клинический положительный ответ в отношении лечения субъекта, страдающего выпадением волос. Аналогичным образом, термины «профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективная доза» относятся к количеству эстетрольного компонента, которое ингибирует или задерживает начало (клинических) проявлений выпадения волос. Специалисту в данной области техники известно, что такие термины, как «количество», «величина» и «уровень», являются синонимами и имеют четко определенное значение в данной области техники, и понятно, что они могут, в частности, относиться к абсолютному количественному определению эстетрольного компонента, что рассматривают как эффективное количество для применений, описанных в настоящем документе, или к относительному количественному определению эстетрольного компонента, такому как, например,

концентрация эстетрольного компонента в зависимости от массы тела субъекта. Подходящие значения или диапазоны значений могут быть получены от одного субъекта или от группы субъектов (то есть от по меньшей мере двух субъектов).

Следует подчеркнуть, что хотя любые из раскрытых в настоящем документе значений и диапазонов эстетрольных компонентов подходят для различных медицинских показаний или целей, специалисту в данной области техники известно, что некоторые индивидуумы могут ощущать еще большую пользу от лечения эстетрольным компонентом при дополнительной оптимизации оптимальной дозы упомянутого компонента путем рассмотрения широкого диапазона параметров, включая, но без какого-либо ограничения, характер и степень состояния или заболевания, подлежащего лечению, пол субъекта, возраст субъекта, массу тела, другие медицинские показания, питание, способ введения, метаболическое состояние, взаимодействие с другими фармацевтически активными ингредиентами или их влияние или эффективность и так далее. Кроме того, каждый индивидуум может иметь определенную внутреннюю степень чувствительности к используемому эстетрольному компоненту.

Такие термины, как «субъект», «пациент», «индивидуум», могут использоваться взаимозаменяемо в настоящем документе и относятся к субъектам-людям, предпочтительно к субъектам женского пола, которые находятся в менопаузальной или перименопаузальной фазе своей жизни.

В равной степени предусмотрены косметические способы предотвращения или уменьшения выпадения волос, предусматривающие стадию системного введения композиции, содержащей эстетрольный компонент. Другими словами, настоящее изобретение в равной степени предусматривает косметическое применение композиции, содержащей эстетрольный компонент, для предотвращения или уменьшения выпадения волос. Специалисту в данной области техники понятно, что «косметическое применение» подразумевает «немедицинское, нетерапевтическое применение», то есть применение, которое не направлено на улучшение, предотвращение или лечение клинической патологии.

Терапевтическая или косметическая терапия согласно настоящему изобретению обычно предполагает непрерывное введение эстетрольного компонента в течение периода по меньшей мере 10 дней, предпочтительно по меньшей мере 20 дней.

Эстетрольный терапевтический или косметический компонент вводят в ежедневной дозе от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг эстетрольного компонента, предпочтительно эстетрола, более предпочтительно моногидрата эстетрола.

Согласно конкретному варианту осуществления эстетрольный компонент вводят в ежедневной дозе от приблизительно 14 мг до приблизительно 21 мг.

Согласно другому конкретному варианту осуществления эстетрольный компонент вводят в ежедневной дозе от приблизительно 14 мг до приблизительно 16 мг или от приблизительно 19 мг до приблизительно 21 мг.

Согласно одному варианту осуществления терапевтическую или косметическую терапию согласно настоящему изобретению вводят пациентам без гистерэктомии. Согласно конкретному варианту осуществления терапевтическая или косметическая терапия согласно настоящему изобретению включает в себя ежедневно введение приблизительно 15 мг или 20 мг эстетрольного компонента, предпочтительно пациентам без гистерэктомии.

В тех случаях, когда терапевтическую или косметическую терапию согласно настоящему изобретению вводят пациенту, перенесшему гистерэктомию, эстетрольный компонент предпочтительно вводят без прогестагенового компонента или даже в качестве единственного активного ингредиента.

Когда терапию согласно настоящему изобретению вводят пациентам без гистерэктомии, эстетрольный компонент можно вводить в качестве единственного активного ингредиента или можно вводить вместе с необязательным прогестагеновым компонентом. Упомянутый необязательный прогестагеновый компонент можно вводить непрерывно (то есть каждый день в дополнение к эстетрольному компоненту) или последовательно (причем «последовательно» означает введение прогестагенового компонента в течение, например, 10-14 дней каждый месяц или в течение 14 дней каждые 3 месяца).

Термины «непрерывный»/«непрерывно» при использовании в настоящем документе означают, что компоненты вводят через относительно регулярные промежутки времени без (терапевтически) значимых перерывов. Естественно, могут возникать незначительные перерывы, которые не влияют на общую эффективность настоящего способа, и такие отклонения действительно охватываются настоящим изобретением. Согласно предпочтительному варианту осуществления и с более арифметической точки зрения схему введения считают непрерывной, если самый длинный интервал между двумя последовательными введениями не более чем в 3,5 раза превышает средний интервал. Еще более предпочтительно, упомянутый самый длинный интервал превышает средний интервал не более чем в 2,5 раза, наиболее предпочтительно не более чем в 1,5 раза.

Согласно одному варианту осуществления необязательный прогестагеновый компонент вводят непероральным путем, например с использованием внутриматочного

устройства (Intra Uterine Device, IUD). Согласно одному варианту осуществления упомянутое IUD доставляет прогестагеновый компонент левоноргестрел. Согласно одному такому варианту осуществления IUD представляет собой IUD Mirena® или IUD Levosert®.

Поэтому специалисту в данной области техники понятно, что эстетрольный компонент можно вводить в сочетании с любыми другими косметическими или фармацевтически активными средствами для ослабления или предотвращения выпадения волос, известными в данной области техники.

Согласно одному варианту осуществления терапевтическая или косметическая терапия согласно настоящему изобретению использует пероральное, сублингвальное, буккальное или сублабиальное введение эстетрольного компонента. Эти последние три способа введения обладают тем преимуществом, что эстетрольный компонент не должен проходить через пищеварительную систему и избегает воздействия первичного прохождения через печень. Кроме того, эти способы введения обеспечивают быстрое начало действия.

Термин «сублингвальный» при использовании в настоящем документе относится к фармакологическому пути введения, при котором эстетрольный компонент диффундирует в кровь через ткани под языком.

Термин «буккальный» при использовании в настоящем документе относится к фармакологическому пути введения, при котором эстетрольный компонент диффундирует в кровь через ткани буккального преддверия, области внутри рта между выстилкой щеки (буккальной слизистой оболочкой) и зубами/деснами.

Термин «сублабиальный» при использовании в настоящем документе относится к фармакологическому пути введения, при котором эстетрольный компонент помещается между губой и десной.

В терапевтических или косметических способах согласно настоящему изобретению эстетрольный и прогестагеновый компоненты можно вводить в отдельных единицах дозирования. Однако также возможно и действительно очень удобно объединить эти два компонента в одну единицу дозирования.

В терапевтических или косметических способах в соответствии с настоящим изобретением комбинацию прогестагенового и эстетрольного компонента целесообразно вводить непрерывно в течение периода по меньшей мере 10 дней.

Настоящее изобретение можно соответствующим образом применять на практике в форме различных способов введения, которые известны специалисту в данной области техники. К таким способам относятся способы с использованием монофазных препаратов,

которые содержат единицы дозирования с постоянным количеством эстетрольного компонента и необязательного прогестагенового компонента.

Согласно варианту осуществления настоящего изобретения, в котором выбрано последовательное введение прогестагенового компонента, также возможно и удобно объединить компоненты в одну единицу дозирования на те дни, когда вводят два компонента.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения терапию вводят субъекту в период постменопаузы.

Согласно определенным вариантам осуществления композицию, описанную в настоящем документе, которая представляет собой композицию, предназначенную для системного введения, используют в сочетании с косметической композицией, предназначенной для местного (то есть кожного) введения, которая не содержит эстроген, причем, предпочтительно, упомянутая косметическая композиция не содержит гормон.

### Композиции

Эстетрольный компонент настоящего изобретения охватывает вещества, выбранные из группы, состоящей из эстетрола, сложных эфиров эстетрола, в которых атом водорода по меньшей мере одной из гидроксильных групп замещен ацильным радикалом углеводородной карбоновой, сульфоновой кислоты или сульфаминовой кислоты длиной 1-25 атомов углерода; и их комбинаций. Более предпочтительно, эстетрольный компонент представляет собой эстетрол (включая гидраты эстетрола). Наиболее предпочтительно, эстетрольный компонент, содержащийся в единице дозирования, представляет собой моногидрат эстетрола.

Эстетрольный компонент настоящего изобретения применяют в ежедневной дозе, эквивалентной от приблизительно 15 мг до приблизительно 25 мг моногидрата эстетрола. Другими словами, когда эстетрольный компонент представляет собой не сам моногидрат эстетрола, ежедневную дозу эстетрольного компонента корректируют для достижения терапевтического эффекта, эквивалентного эффекту ежедневной дозы от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг моногидрата эстетрола, такой как, например, от приблизительно 14 мг до 16 мг эстетрола, предпочтительно моногидрата эстетрола, или от приблизительно 19 мг до 21 мг эстетрола, предпочтительно моногидрата эстетрола.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением предназначена для ежедневного введения, то есть она представляет собой единицу дозирования для ежедневного введения.

В случае перорального введения единица дозирования для перорального введения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой, предпочтительно, твердую или полутвердую единицу дозирования (взаимозаменяемо обозначается термином «лекарственная форма»), такую как таблетки, капсулы, облатки, пеллеты, пилюли, порошки и гранулы. Термин «твердая или полутвердая единица дозирования» также охватывает капсулы, которые содержат жидкость, например масло, в которой растворен или диспергирован эстетрольный компонент согласно настоящему изобретению и/или необязательный прогестагеновый компонент. Таблетки и эквивалентные твердые и полутвердые единицы дозирования могут содержать такие материалы, как связующие вещества (например, гидроксипропилметилцеллюлозу, поливинилпирролидон, другие целлюлозные материалы и крахмал), разбавители (например, лактозу и другие сахара, крахмал, дикальцийфосфат и целлюлозные материалы), средства для улучшения распадаемости (например, полимеры крахмала и целлюлозные материалы) и смазывающие средства (например, стеараты и тальк). Эти таблетки и эквивалентные твердые единицы дозирования могут быть получены путем влажной грануляции, например с использованием водного раствора или органического раствора, а также путем прямого прессования.

В случае сублингвального, буккального или сублабиального введения фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой диспергируемую в полости рта единицу дозирования.

Термин «диспергируемая в полости рта единица дозирования» при использовании в настоящем документе относится к единице дозирования, которая предназначена для быстрого распада в полости рта при контакте со слюной и для диспергирования эстетрольного компонента в слюну, чтобы он мог абсорбироваться через слизистую оболочку полости рта.

Когда единица дозирования представляет собой диспергируемую в полости рта единицу дозирования, скорость высвобождения эстетрольного компонента из единицы дозирования может быть надлежащим образом определена с использованием теста на распад в соответствии с Ph. Eur. 2.9.1 («Распад таблеток и капсул») и USP <701> («Распад»), например с использованием воды в качестве среды распада. Диспергируемая в полости рта твердая единица дозирования согласно настоящему изобретению при проведении вышеупомянутого теста на распад обычно распадается в течение менее чем 5 минут, более предпочтительно в течение менее чем 2 минут, еще более предпочтительно в течение менее чем 15 минут, еще более предпочтительно в течение менее чем 1 минуты, еще более предпочтительно в течение менее чем 45 секунд и, наиболее предпочтительно, в течение менее чем 30 секунд.

Согласно одному варианту осуществления единица дозирования содержит эстетрольный компонент но не прогестагеновый компонент.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к комбинированной единице дозирования для ежедневного перорального введения, содержащей эстетрольный компонент и прогестагеновый компонент.

Предпочтительно, прогестагеновый компонент выбирают из группы, состоящей из прогестерона, дроспиренона, дидрогестерона, предшественников этих прогестагенов и их смесей.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к комбинированной композиции, содержащей эстетрольный компонент вместе с прогестероном.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к комбинированной композиции, содержащей эстетрольный компонент вместе с дроспиреноном.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к комбинированной композиции, содержащей эстетрольный компонент вместе с дидрогестероном.

Эстетрол и прогестагеновый компонент могут присутствовать в отдельных единицах дозирования для перорального введения или могут быть объединены в одной единице дозирования для перорального введения.

Когда прогестагеновый компонент настоящего изобретения представляет собой дроспиренон, его, предпочтительно, используют в ежедневной дозе от 0,25 мг до 10 мг, еще более предпочтительно от приблизительно 0,25 мг до приблизительно 4 мг, например от приблизительно 1 мг до 4 мг, от приблизительно 1 мг до 3 мг или от приблизительно 2,5 мг до 3,5 мг в день, предпочтительно приблизительно 3 мг.

Когда прогестагеновый компонент настоящего изобретения представляет собой дидрогестерон, его, предпочтительно, используют в ежедневной дозе от приблизительно 5 мг до приблизительно 10 мг, более предпочтительно в ежедневной дозе приблизительно 5 мг.

Когда прогестагеновый компонент настоящего изобретения представляет собой прогестерон, его, предпочтительно, используют в ежедневной дозе от 50 мг до 200 мг. Согласно одному варианту осуществления прогестерон используют в ежедневной дозе от 50 мг до 100 мг, когда его используют непрерывно. Согласно другому варианту осуществления прогестерон используют в ежедневной дозе от 100 мг до 200 мг, когда его

используют последовательно, например когда его водят в течение приблизительно 14 дней каждый месяц.

Когда используют другой прогестагеновый компонент, ежедневную дозу корректируют таким образом, чтобы обеспечить такой же фармакологический эффект, что и у дозы от 50 мг до 200 мг прогестерона.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения композиция объединяет эстетрольный компонент и необязательный прогестагеновый компонент в одну единицу дозирования, предпочтительно единицу дозирования для ежедневного введения. Согласно более предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения упомянутая комбинированная единица дозирования для ежедневного введения представляет собой комбинированную единицу дозирования для перорального ежедневного введения.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к пероральной комбинированной единице дозирования для ежедневного введения, содержащей эстетрольный компонент и прогестерон.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к комбинированной единице дозирования для перорального ежедневного введения, содержащей эстетрольный компонент и дроспиренон.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к комбинированной единице дозирования для перорального ежедневного введения, содержащей эстетрольный компонент и дидрогестерон.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения предлагается комбинированная единица дозирования для перорального ежедневного введения, объединяющая эстетрол в ежедневной дозе приблизительно 20 мг с прогестероном в ежедневной дозе приблизительно 100 мг.

Согласно предпочтительному варианту осуществления предлагается комбинированная единица дозирования для перорального ежедневного введения, объединяющая ежедневную дозу от 14 мг до 16 мг эстетрола или от 19 мг до 21 мг эстетрола, предпочтительно моногидрата эстетрола, и приблизительно от 2,5 до 3,5 мг дроспиренона.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения эстетрольный компонент вводят пациенту, у которого еще есть матка, в сочетании с селективным модулятором эстрогеновых рецепторов (SERM), в частности в сочетании с базедоксифеном. Предпочтительно, базедоксифен вводят в ежедневной дозе

приблизительно от 10 мг до 50 мг. Более предпочтительно, базедоксифен вводят в ежедневной дозе приблизительно 20 мг.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к терапии, исключаяющей прогестагеновые компоненты.

Значение терминов «модулирование среднего уровня», или «модулирование уровня», или «снижение уровня», или «повышение уровня» при использовании в настоящем документе следует рассматривать как охватывающее соответственно модулирование, снижение или повышение уровня экспрессии белка и/или иРНК упомянутого вещества по сравнению с базальным средним уровнем у субъекта, имеющего определенное состояние. Уровень белка у субъекта можно, например, анализировать с использованием стандартных методов, таких как ELISA, на образце субъекта. Уровень экспрессии иРНК у субъекта можно, например, анализировать с использованием стандартных методов, таких как количественная ПЦР-РВ (кПЦР) на образце субъекта. Согласно другому варианту осуществления модуляция включает в себя повышение уровня белка или экспрессии.

Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления эстетрольный компонент содержится в твердой единице дозирования, причем, предпочтительно, каждая твердая дозировка содержит приблизительно от 10 мг до 25 мг, например приблизительно от 14 мг до 21 мг, или приблизительно от 14 мг до 16 мг, или приблизительно от 19 мг до 21 мг, или приблизительно 15 мг, или приблизительно 20 мг эстетрольного компонента. Согласно более предпочтительным вариантам осуществления эстетрольный компонент содержится в таблетке, каплете или капсуле, наиболее предпочтительно в таблетке. Согласно дополнительным вариантам осуществления твердую единицу дозирования составляют так, чтобы она соответствовала твердой единице дозирования для ежедневного введения. Согласно другим дополнительным вариантам осуществления твердая единица дозирования представляет собой единицу дозирования для перорального введения (то есть единицу дозирования, которая предназначена для проглатывания субъектом). Следовательно, согласно определенным вариантам осуществления медицинское применение или способ лечения предусматривают ежедневный прием твердой единицы дозирования, содержащей эффективное количество эстетрола. Согласно определенным вариантам осуществления эффективное количество эстетрольного компонента содержится в одной единице дозирования, которая дополнительно содержит по меньшей мере одно фармацевтически активное средство, которое может представлять собой прогестин, как определено в другом месте в настоящем документе, или может представлять собой

дополнительный косметический или (фармацевтически) активный ингредиент для предотвращения или лечения выпадения волос.

Согласно альтернативным вариантам осуществления твердая единица дозирования подходит для сублингвального, буккального и/или сублабиального введения. Согласно таким вариантам осуществления твердая единица дозирования способна быстро высвободить эстетрольный компонент при контакте с водным растворителем, таким как слюна. Следовательно, согласно этим вариантам осуществления твердая единица дозирования представляет собой диспергируемую в полости рта единицу дозирования, которая высвобождает по меньшей мере приблизительно 50%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80%, наиболее предпочтительно более чем приблизительно 80% эстетрольного компонента в течение приблизительно 5 минут, предпочтительно в течение приблизительно 3 минут, более предпочтительно в течение приблизительно 2,5 минуты, более предпочтительно в течение приблизительно 90 секунд, наиболее предпочтительно в течение приблизительно 90 секунд. Термин «диспергируемая в полости рта единица дозирования» при использовании в настоящем документе относится к единице дозирования, которая предназначена для быстрого распада в полости рта при контакте со слюной и для диспергирования эстетрольного компонента в слюну, чтобы он мог абсорбироваться через слизистую оболочку полости рта. Специалисту в данной области техники известны способы определения скорости высвобождения эстетрольного компонента из единицы дозирования. К неограничивающим стандартизированным тестам, общепринятым в данной области техники, относятся тест на распад в соответствии с Ph. Eur. 2.9.1 («Распад таблеток и капсул») и USP <701> («Распад»), например с использованием воды в качестве среды распада.

Согласно определенным вариантам осуществления эстетрольный компонент содержится в единице дозирования или композиции с немедленным высвобождением. Согласно альтернативным вариантам осуществления эстетрольный компонент содержится в единице дозирования или композиции с отсроченным высвобождением, с продолжительным высвобождением или с контролируемым высвобождением. Термины «с немедленным высвобождением», «с отсроченным высвобождением» и «с продолжительным высвобождением» или «с контролируемым высвобождением» понятны специалисту в данной области техники и указывают на профиль высвобождения фармацевтической композиции. При немедленном высвобождении фармацевтическая композиция практически мгновенно высвобождается из единицы дозирования в организм

субъекта или пациента. В единицах дозирования с отсроченным высвобождением фармацевтическая композиция доставляется в организм с задержкой после введения. В единицах дозирования с продолжительным высвобождением или с контролируемым высвобождением единица дозирования предназначена для высвобождения фармацевтической композиции с заранее заданной скоростью, для того чтобы поддерживать постоянную концентрацию лекарственного средства в течение определенного периода времени. Профиль высвобождения единицы дозирования можно оценивать, как описано в основных фармакопеях. Например, немедленное высвобождение определяется Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency) как растворение по меньшей мере 75% активного вещества в течение 45 минут (Европейская фармакопея (European Pharmacopoeia, Ph. Eur.), 9-е издание). Однако для специалиста в данной области техники также очевидно, что подходящие тесты и временные окна могут варьироваться в зависимости от терапевтических диапазонов, факторов растворимости и проницаемости лекарственного вещества.

Согласно альтернативным вариантам осуществления способы введения, которые можно рассматривать в контексте настоящего изобретения, конкретно не ограничены, при условии, что они приводят к системной биодоступности. К ним относятся, но без ограничения: пероральное, ректальное, бронхиальное, назальное, буккальное, сублингвальное, вагинальное, чрескожное, подкожное, внутриматочное или парентеральное введение или введение в форме, подходящей для введения путем ингаляции или инсуффляции, включая порошки и жидкие аэрозоли. Согласно предпочтительным вариантам осуществления способом введения является пероральное введение. Следует понимать, что пероральное введение включает в себя введение путем перорального приема, но дополнительно включает в себя такие способы введения, как буккальное и сублингвальное введение, необязательно с помощью диспергируемой в полости рта единицы дозирования, такой как, но без ограничения, диспергируемая в полости рта таблетка. Во всех случаях целью является достижение такой же эффективной дозы эстетрола в плазме крови (например, аналогичных значений AUC и/или C<sub>max</sub>), что и при использовании единицы дозирования для перорального введения.

Согласно определенным вариантам осуществления эстетрольный компонент составляют в виде единицы дозирования, включая, но без ограничения, твердые капсулы, мягкие капсулы, таблетки, таблетки с покрытием, такие как лакированные таблетки или таблетки с сахарным покрытием, гранулы, водные или масляные растворы, сиропы, эмульсии, суспензии, летучие препараты или суппозитории, которые могут быть представлены в любых подходящих упаковочных средствах, известных в данной области

техники, неограничивающими примерами являются пастилки, саше, мешочки, флаконы, пленки, спреи, микрокапсулы, имплантаты, стержни или блистерные упаковки. Согласно вариантам осуществления, в которых эффективное количество эстетрольного компонента вводят посредством перорального введения, единица дозирования для перорального введения в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно, представляет собой твердую или полутвердую единицу дозирования, такую как таблетки, капсулы, облатки, пеллеты, пилюли, порошки и гранулы. Особенно предпочтительная композиция содержит моногидрат эстетрола в дозировках, раскрытых в настоящем документе, в комбинации с вспомогательными веществами, подходящими для твердой или полутвердой единицы дозирования.

Термин «твердая или полутвердая единица дозирования» также охватывает капсулы, которые содержат жидкость, например масло, в которой растворен или диспергирован эстетрольный компонент согласно настоящему изобретению и/или необязательный прогестагеновый компонент. Таблетки и эквивалентные твердые и полутвердые единицы дозирования могут содержать такие материалы, как связующие вещества (например, гидроксипропилметилцеллюлозу, поливинилпирролидон, (повидон, PVP), другие целлюлозные материалы и крахмал), разбавители (например, лактозу (моногидрат) и другие сахара, крахмал (например, кукурузный крахмал), дикальцийфосфат и целлюлозные материалы), средства для улучшения распадаемости (например, полимеры крахмала и целлюлозные материалы (например, натрия крахмал гликолят)) и смазывающие средства (например, стеараты (магния) и тальк). Эти таблетки и эквивалентные твердые единицы дозирования могут быть получены с помощью любого подходящего способа, который подробно описан в данной области техники (например, в документе Kaur, Processing technologies for pharmaceutical tablets: A review, Int Res J Pharm, 2012). Неограничивающими примерами обработки эстетрольного компонента при производстве единицы дозирования служат влажная грануляция, например с использованием водного раствора или органического раствора, прямое прессование, 3D-печать, или покрытие частиц носителя эстетрольным компонентом с использованием органического или неорганического растворителя.

Очевидно, что дополнительный аспект настоящего изобретения относится к фармацевтическим или косметическим композициям, содержащим эффективное количество эстетрольного компонента, для применения по любому из медицинских показаний, раскрытых в настоящем документе. Термины «состав» или «композиция» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо. Согласно любому из вариантов осуществления, касающихся одной или нескольких из фармацевтических или

косметических композиций, описанных в настоящем документе, очевидно, что упомянутая композиция может содержать один или несколько фармацевтически или косметически приемлемых носителей (то есть вспомогательных веществ). Термин «фармацевтически приемлемый» или «косметически приемлемый» при использовании в настоящем документе соответствует уровню техники и означает, что он совместим с другими ингредиентами фармацевтической или косметической композиции и не вреден для ее реципиента. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением предназначена для ежедневного введения, то есть она представляет собой единицу дозирования для ежедневного введения. Вспомогательные вещества, которые можно использовать в фармацевтической композиции, конкретно не ограничены и, следовательно, могут представлять собой одно или несколько вспомогательных веществ, выбранных из группы, состоящей из: вспомогательных веществ активного фармацевтического ингредиента, связующих вспомогательных веществ, вспомогательных веществ-носителей, совместно обработанных вспомогательных веществ, вспомогательных веществ системы покрытия, вспомогательных веществ с контролируемым высвобождением, вспомогательных веществ-разбавителей, вспомогательных веществ для улучшения распадаемости, вспомогательных веществ для ингаляции сухим порошком, вспомогательных веществ шипучих систем, вспомогательных веществ-эмульгаторов, липидных вспомогательных веществ, смазывающих вспомогательных веществ, вспомогательных веществ с модифицированным высвобождением, усиливающих проникновение вспомогательных веществ, усиливающих проницаемость вспомогательных веществ, вспомогательных веществ-модификаторов pH, вспомогательных веществ-пластификаторов, вспомогательных веществ-консервантов, вспомогательных веществ-консервантов, вспомогательных веществ-солубилизаторов, вспомогательных веществ-растворителей, вспомогательных веществ с продолжительным высвобождением, вспомогательных веществ-подсластителей, вспомогательных веществ для придания вкуса, вспомогательных веществ-загустителей, вспомогательных веществ-модификаторов вязкости, вспомогательных веществ-наполнителей, вспомогательных веществ для уплотнения, вспомогательных веществ для сухой грануляции, вспомогательных веществ для горячей экструзии, вспомогательных веществ для влажной грануляции, вспомогательных веществ-средств для быстрого высвобождения, вспомогательных веществ с повышенной биодоступностью, вспомогательных веществ для дисперсии, улучшающих растворимость вспомогательных веществ, вспомогательных веществ-стабилизаторов, вспомогательных веществ для наполнения капсул или любой их комбинации. Специалисту в данной области техники известно, что использование таких

сред и средств для фармацевтических активных веществ является обычной практикой, и поэтому введение этих вспомогательных веществ хорошо известно в данной области техники. Очевидно, что все используемые ингредиенты должны быть нетоксичными в концентрации, содержащейся в конечной фармацевтической композиции, и не должны отрицательно влиять на активность эстетрольного компонента, причем упомянутый эстетрольный компонент, предпочтительно, присутствует в фармацевтической композиции в качестве преобладающего фармацевтически активного ингредиента. Согласно определенным вариантам осуществления к фармацевтической композиции добавляют больше одного вспомогательного вещества, которые специалист в данной области техники отнесет к одной и той же группе вспомогательных веществ. Согласно дополнительным вариантам осуществления к фармацевтической композиции добавляют больше одного вспомогательного вещества, причем разные вспомогательные вещества принадлежат к разным группам. Согласно определенным вариантам осуществления вспомогательные вещества могут выполнять больше одной функции и/или могут быть отнесены специалистом в данной области техники к различным группам или классам вспомогательных веществ.

Композиции, предусмотренные настоящим изобретением, могут содержать дополнительные активные в отношении кожи компоненты, способные оказывать положительный эффект при уходе за кожей. К положительным эффектам при уходе за кожей может относиться, но без ограничения, положительный эффект, связанный с косметическим внешним видом кожи. Дополнительный активный в отношении кожи компонент может обеспечивать немедленный и кратковременный (то есть экстренный) положительный эффект и/или долгосрочный и длительный (то есть хронический) положительный эффект.

Композиции, предусмотренные настоящим изобретением, могут содержать дополнительные предотвращающие выпадение волос или способствующие уходу за волосами активные компоненты, способные оказывать положительный эффект при уходе за волосами, известные в данной области техники. К положительным эффектам при уходе за волосами может относиться, но без ограничения, положительный эффект, связанный с косметическим внешним видом волос, а также с их ростом. Дополнительный активный компонент для ухода за волосами может обеспечивать немедленный и кратковременный (то есть экстренный) положительный эффект и/или долгосрочный и длительный (то есть хронический) положительный эффект.

Хотя настоящее изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, очевидно, что специалистам в данной области техники в свете

приведенного выше описания будет очевидно множество альтернатив, модификаций и вариаций. Соответственно, предполагается, что оно охватывает все такие альтернативы, модификации и вариации, как указано ниже, в соответствии с сущностью и широким объемом прилагаемой формулы изобретения. Раскрытые в настоящем документе аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно подтверждаются следующими неограничивающими примерами.

Следующие конкретные экспериментальные примеры представлены для поддержки заявленного изобретения, но их не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

### **Примеры**

#### **Пример 1: Распределение эстетрола в тканях после перорального введения в модели на крысах**

Распределение в тканях определяли у самок крыс (частично пигментированных и непигментированных) с использованием [ $^{14}\text{C}$ ]-эстетрола.

После однократной пероральной дозы [ $^{14}\text{C}$ ]-эстетрола самкам непигментированных крыс концентрации радиоактивности обычно были максимальными в первой временной точке 0,5 часа, причем наибольшую концентрацию измеряли в печени (12,5 эквивалента мкг на г). Радиоактивность быстро исчезала, так что через 24 часа после введения, помимо компонентов ЖКТ и мочевого пузыря, поддавались количественной оценке только надпочечники, почки, печень, поджелудочная железа, слюнная железа и щитовидная железа.

После однократной пероральной дозы [ $^{14}\text{C}$ ]-эстетрола самкам частично пигментированных крыс концентрации радиоактивности обычно были максимальными в первой временной точке 0,5 часа после перорального введения дозы, причем наибольшую концентрацию измеряли в печени (13,7 эквивалента мкг на г). Радиоактивность вновь быстро исчезала, причем большинство тканей оказались BLQ (Below the Limit of Quantification, ниже предела количественного определения) (<0,076 эквивалента мкг на г) через 24 часа после введения дозы. Через 7 дней после введения дозы все анализируемые ткани, за исключением печени (0,410 эквивалента мкг на г), находились на пределе количественного определения или ниже него, включая меланинсодержащие структуры (увеальный тракт, пигментированную кожу).

#### **Протокол – исследование распределения в тканях у непигментированных крыс**

Группа из семи самок крыс Sprague-Dawley получала однократную пероральную дозу [ $^{14}\text{C}$ ]-эстетрола. В каждый выбранный момент времени (смотри ниже) одно животное

умерщвляли (путем передозировки CO<sub>2</sub>) с последующим мгновенным замораживанием в гексане/твердом CO<sub>2</sub>. Тела оставляли для исследования распределения радиоактивности в тканях с использованием метода количественной автордиографии всего тела (quantitative whole body autoradiography, QWBA).

Время анализа составляло: 0,5, 1, 2, 5, 8, 24 и 48 часов.

После завершения автордиографии всего тела оставшиеся тела утилизировали как отходы.

Распределение радиоактивности в тканях определяли и количественно оценивали с использованием анализатора флуоресцентных изображений Fuji FLA-5100 и соответствующего программного обеспечения Tina и SeeScan. Концентрации радиоактивности в тканях определяли с использованием калиброванных автордиографических микровесов производства GE Healthcare. Стандартную кривую строили с использованием микровесов, на которых определяли концентрации радиоактивности в тканях (нКи/г). Эти значения затем преобразовывали в эквиваленты мкг на г с использованием удельной активности состава дозы.

#### Протокол – исследование распределения в тканях у пигментированных крыс

Группа из шести самок крыс Lister Hooded получала однократную пероральную дозу [<sup>14</sup>C]-эстетрола. В каждый выбранный момент времени (смотри ниже) одно животное умерщвляли (путем передозировки CO<sub>2</sub>) с последующим мгновенным замораживанием в гексане/твердом CO<sub>2</sub>. Тела оставляли для исследования распределения радиоактивности в тканях с использованием метода количественной автордиографии всего тела (QWBA).

Время анализа составляло: (0,5, 8 и 24 часа, 7, 14 и 35 дней)

Замороженные тела подвергали автордиографии всего тела.

#### Результаты у непигментированных крыс (с фокусом на коже)

В тех случаях, когда указаны концентрации, предполагалось, что радиоактивность связана с [<sup>14</sup>C]-эстетролом или любыми продуктами метаболизма, полученными из [<sup>14</sup>C]-эстетрола. Во всех случаях для расчета концентраций использовали удельную активность дозированных тестируемых соединений. Восстановление радиоактивности указывается в процентах от введенной радиоактивности (% дозы). Концентрации радиоактивности также указываются в эквивалентах мкг на г.

Концентрации радиоактивности в тканях (в данном случае только кожа) и соотношения ткань:кровь, полученные у самок крыс Sprague-Dawley после однократной пероральной дозы [<sup>14</sup>C]-эстетрола, представлены в таблицах 1 и 2, соответственно.

**Таблица 1: Концентрация радиоактивности (выраженная в эквивалентах микрограммов на грамм) в тканях после однократного перорального введения [<sup>14</sup>C]-эстетрола самкам непигментированных крыс при номинальном уровне дозы 15 мг/кг.**

Ткань	Крыса 07F 0,5 часа	Крыса 08F 1 час	Крыса 09F 2 часа	Крыса 10F 5 часов	Крыса 11F 8 часов	Крыса 12F 24 часа	Крыса 13F 48 часов
Кожа: Непигментированная	2,59	0,771	0,465	0,189	0,361	BLQ	BLQ

**Таблица 2: Соотношения ткань:кровь, определенные после однократного перорального введения [<sup>14</sup>C]-эстетрола самкам непигментированных крыс при номинальном уровне дозы 15 мг/кг.**

Ткань	Крыса 07F 0,5 часа	Крыса 08F 1 час	Крыса 09F 2 часа	Крыса 10F 5 часов	Крыса 11F 8 часов	Крыса 12F 24 часа	Крыса 13F 48 часов
Кожа: Непигментированная	1,05	0,99	1,72	1,66	1,77	н/р	н/р

Результаты у пигментированных крыс (с фокусом на коже)

Концентрации радиоактивности в тканях и соотношения ткань: кровь, полученные у самок капюшонных крыс Lister после однократной пероральной дозы [<sup>14</sup>C]-эстетрола, представлены в таблицах 3 и 4, соответственно.

**Таблица 3: Концентрация радиоактивности (выраженная в эквивалентах микрограммов на грамм) в тканях после однократного перорального введения [<sup>14</sup>C]-эстетрола самкам частично пигментированных крыс при номинальном уровне 15 мг/кг.**

Ткань	Крыса 14F 0,5 часа	Крыса 15F 8 часов	Крыса 16F 24 часа	Крыса 17F 7 дней	Крыса 18F 14 дней	Крыса 19F 35 дней
Кожа: Непигмент	1,89	0,090	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

ированная						
Кожа: Пигментир ованная	2,85	0,161	0,113	BLQ	BLQ	BLQ

**Таблица 4: Соотношения ткань:кровь, определенные после однократного перорального введения [<sup>14</sup>C]-эстетрола самкам частично пигментированных крыс при номинальном уровне дозы 15 мг/кг.**

Ткань	Крыса 14F 0,5 часа	Крыса 15F 8 часов	Крыса 16F 24 часа	Крыса 17F 7 дней	Крыса 18F 14 дней	Крыса 19F 35 дней
Кожа: Непигмент ированная	0,71	0,56	н/р	н/р	н/р	н/р
Кожа: Пигментир ованная	1,07	1,01	н/р	н/р	н/р	н/р

Общие количества радиоактивности в выбранных тканях/органах, выраженные как % дозы/ткань, % ткани от веса тела взяты в документе Caster [2], представлены в таблице 5.

**Таблица 5: Общее количество радиоактивности в выбранных тканях после однократного перорального введения [<sup>14</sup>C]-эстетрола самкам частично пигментированных крыс при номинальном уровне дозы 15 мг/кг.**

Результаты выражены в % введенной дозы/ткань

Ткань	Крыса 14F 0,5 часа	Крыса 15F 8 часов	Крыса 16F 24 часа	Крыса 17F 7 дней	Крыса 18F 14 дней	Крыса 19F 35 дней
Кожа (непигмент ированная)	1,136	0,059	<0,041	<0,043	<0,038	<0,041
Кожа (пигментир ованная)	1,714	0,099	0,061	<0,043	<0,038	<0,041

Вывод: В момент первого измерения (0,5 часа) радиоактивность исходя из общей дозы на ткань превышала 1% от введенной дозы в пигментированной и непигментированной коже (1,7% и 1,1%, соответственно). Как видно из результатов,

значительные концентрации E4 достигаются в коже после перорального введения, что указывает на то, что эстетрол адекватно достигал кожи, будучи терапевтически эффективным.

### **Пример 2: Влияние E4 in vitro на кератиноциты и фибробласты как два основных типа клеток кожи**

Целью исследования является оценка эффектов эстетрола на способность к миграции и пролиферации человеческих эпидермальных кератиноцитов и человеческих дермальных фибробластов в 2D-культурах и прямое сравнение эффектов этого эстрогена с эстрадиолом в качестве другого эталонного эстрогена (E2).

Исследование заключается в анализе in vitro с целью оценить свойства E4 и E2 в 4 концентрациях на кератиноцитах и фибробластах. В этом анализе проводят измерение колонизации стандартной бесклеточной поверхности, получаемой из сливающегося монослоя клеток, с использованием специального устройства для культивирования (камера IBIDI). Анализ проводят в отсутствие и в присутствии ингибитора пролиферации, чтобы сосредоточить внимание на пролиферации и миграции или только на миграции клеток, соответственно.

#### Методология

##### *Клеточная модель – нормальные эпидермальные кератиноциты человека (NHEK)*

Исследование проводили с использованием культуры нормальных эпидермальных кератиноцитов человека, полученных из крайней плоти (NHEK, Lonza). Клетки выращивали в бессывороточной среде Epilife (ThermoFisher Scientific), дополненной добавкой для роста кератиноцитов человека (HKGS, ThermoFisher Scientific) и антибиотиками. Клетки содержали во влажном инкубаторе при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>.

##### *Клеточная модель – нормальные дермальные фибробласты человека (NHDF)*

Клетки нормальных дермальных фибробластов человека, полученных из крайней плоти (NHDF, ATCC), выращивали в модифицированной среде Игла в модификации Дульбекко, не содержащей фенола (DMEM, ThermoFisher Scientific), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, ThermoFisher Scientific), L-глутамином и антибиотиками. Клетки содержали во влажном инкубаторе при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>.

##### *Анализ и исследование*

Клетки помещали в 2-луночные силиконовые вставки с определенным свободным зазором для клеток (камеры IBIDI; IBIDI GmbH, 80209), которые предварительно вставляли в 12-луночные культуральные планшеты. Это устройство для культивирования позволяет создавать стандартизированный свободный от клеток зазор размером 500 мкм ± 100 мкм

для мониторинга колонизации клеток. Через 24 часа после посева, когда культура достигала высокой конfluence, клетки во вставке обрабатывали или не обрабатывали митомицином С (ММС) в концентрации 10 мкг/мл в течение 2 ч. По истечении этих 2 часов вставку удаляли, и клетки обрабатывали E2 или E4 в присутствии или в отсутствие ММС в течение дополнительных 2 ч. Затем, если необходимо, культуральную среду удаляли, и клетки обрабатывали E2 или E4 в течение 22 ч. в отсутствие ММС.

Для анализа кератиноциты высевали в среду Epilife без HKGS, и все обработки проводили в этой среде. Фибробласты высевали в среду DMEM, содержащую только 25% FBS, и обработки проводили в отсутствие FBS.

E2 и E4 применяли в четырех концентрациях ( $10^{-7}$ М,  $10^{-8}$ М,  $10^{-9}$ М,  $10^{-10}$ М). Параллельно клетки обрабатывали положительным контролем (HKGS 1% для человеческих кератиноцитов и PDGF-BB в концентрации 10 нг/мл для человеческих фибробластов).

Для мониторинга клеточной колонизации и оценки скорости закрытия зазора делали фотографии зазора через разное время: в момент времени 0 ч., соответствующий началу обработки с помощью E2 или E4 и удалению культуральной вставки, в момент времени 6 ч. и в момент времени 24 ч. (соответствующий окончанию обработки с помощью E2 или E4). Фотографии делали с помощью микроскопа Zeiss (объектив Axiovert 25 – 10x) и с помощью камеры Invenio2EIII (DeltaPix – Lux-Optic). Колонизированные области количественно оценивали по фотографиям с использованием платформы WimAasis – программного обеспечения WimScratch. Для каждой вставки делали по 3 фотографии в каждый момент времени. Поскольку для каждого варианта условий проводили по три повторности, это означает всего 9 фотографий для каждого варианта условий и в каждый момент времени получения.

### Результаты

#### *Нормальные эпидермальные кератиноциты человека (NHEK)*

Обработка с помощью HKGS, используемая в качестве положительного эталона, позволяла значительно увеличить область колонизации, как в присутствии, так и в отсутствие ММС, что подтверждает достоверность теста.

В присутствии ингибитора пролиферации (ММС) E4 в концентрации  $10^{-7}$ М и  $10^{-10}$ М значительно увеличивал колонизацию бесклеточной области по сравнению с контролем этанолом после 24 ч. обработки, что указывает на стимуляцию миграции клеток (фигура 1). В отсутствие ММС через 6 ч. E4 в концентрациях  $10^{-7}$ М и  $10^{-10}$ М значительно увеличивали колонизацию бесклеточной области по сравнению с контролем этанолом (фигура 2).

В присутствии или в отсутствие ингибитора пролиферации (ММС) E2 не был способен значительно увеличивать колонизацию бесклеточной области по сравнению с контролем этанолом (фигура 3 и 4). В концентрациях между  $10^{-7}$ М и  $10^{-9}$  М он, по-видимому, даже оказывает ингибирующее действие на закрытие зазора после 24 ч. обработки. Этот ингибирование значимо только для концентрации  $10^{-8}$ М.

*Нормальные дермальные фибробласты человека (NHDF)*

Обработка PDGF-BB в концентрации 10 нг/мл, используемая в качестве положительного эталона, значительно увеличивает область колонизации как в присутствии, так и в отсутствие ММС, что подтверждает достоверность анализа.

В отсутствие ингибитора пролиферации (ММС) E4 не был способен значительно увеличивать колонизацию бесклеточной области (фигура 6). Но в присутствии ММС E4 в концентрациях  $10^{-7}$ М и  $10^{-8}$ М через 24 ч. позволял значительно увеличить колонизацию бесклеточной области по сравнению с контролем этанолом (фигура 5).

В присутствии ингибитора пролиферации (ММС) E2 не был способен значительно увеличивать колонизацию бесклеточного зазора (фигура 7). Но в отсутствие ММС E2 в концентрациях  $10^{-7}$ М,  $10^{-8}$ М и  $10^{-10}$ М через 24 ч. увеличивал колонизацию бесклеточной области по сравнению с контролем этанолом (фигура 8).

Вывод

В этом исследовании авторы заметили, что E4 в концентрациях  $10^{-7}$ М и  $10^{-10}$ М значительно увеличивает поверхность, колонизированную с течением времени кератиноцитами в культуре. Эффекты были значительными через 6 ч. и 24 ч. обработки, соответственно в отсутствие и в присутствии ММС. Таким образом, E4 может оказывать стимулирующее действие на пролиферацию клеток, что наблюдается после 6 ч. обработки, но может также индуцировать миграцию кератиноцитов после определенной задержки, если принять во внимание разницу в колонизированной поверхности, наблюдаемую через 24 ч. в присутствии ингибитора пролиферации. В присутствии E2 не наблюдали значительного влияния на пролиферацию или миграцию кератиноцитов.

E4 и E2 продемонстрировали значительную активность в культурах фибробластов после 24 ч. обработки, причем E4 скорее воздействовал на миграцию клеток (в концентрациях  $10^{-7}$ М и  $10^{-8}$ М), тогда как E2, по-видимому, оказывал специфическое воздействие на пролиферацию фибробластов (в концентрациях  $10^{-7}$ М,  $10^{-8}$ М и  $10^{-10}$ М). Результаты обобщены в таблице 6 ниже:

**Таблица 6: Активность эстетрола (E4) или эстрадиола (E2) в отношении кератиноцитов (NHEK) и фибробластов (NHDF)**

	NHEK	NHDF
--	------	------

		Пролиферация и миграция	Миграция (+ММС)	Пролиферация и миграция	Миграция (+ММС)
<b>Эстетрол (E4)</b>	10 <sup>-7</sup> М	↗ 6 ч.	↗ 24 ч.	-	↗ 24 ч.
	10 <sup>-8</sup> М	-	-	-	↗↗ 24 ч.
	10 <sup>-9</sup> М	-	-	-	-
	10 <sup>-10</sup> М	↗ 6 ч.	↗ 24 ч.	-	-
<b>Бета- эстрадиол (E2)</b>	10 <sup>-7</sup> М	-	-	↗ 24 ч.	-
	10 <sup>-8</sup> М	-	-	↗ 24 ч.	-
	10 <sup>-9</sup> М	-	-	-	-
	10 <sup>-10</sup> М	-	-	↗ 24 ч.	-

**Пример 3: Влияние эстетрола (E4) на кератиноциты, фибробласты и иммунные клетки в модели заживления ран in vitro**

Реакция на острую рану включает в себя ряд локально активируемых и периферически рекрутируемых типов клеток. В данном пилотном исследовании изучали влияние эстетрола (E4) на несколько типов клеток, связанных с ранами (кератиноциты, фибробласты и иммунные клетки), с прямым сравнением с эффектами эстрадиола (E2).

Эксперименты с кератиноцитами и фибробластами

*Протокол*

Человеческую кожу передавали в лабораторию в среде для хранения (DMEM, содержащая 4% раствор пенициллина-стрептомицина и амфотерицина В) в течение 30 минут после получения. После обезжиривания кожу промывали в HBSS с помощью 4% PSA, а затем DPBS без антибиотиков, затем разрезали на тонкие полоски и помещали на поверхность 0,2% раствора диспазы II в DPBS на ночь при 4°C, после чего вручную отделяли эпидермис от дермы. Затем выделяли первичные человеческие эпидермальные кератиноциты и первичные человеческие дермальные фибробласты.

Сливающиеся лунки первичных кератиноцитов и фибробластов подвергали хорошо проверенной процедуре нанесения царапин (с использованием стерильного кончика фильтра 1 мл). После царапания клетки промывали с помощью DPBS, и в каждую лунку добавляли специфичную для клеток среду, содержащую обработки. Клетки визуализировали на птихографической платформе для визуализации живых клеток (Livecyte 2<sup>TM</sup>, Phasefocus) в течение 24-48 часов. Автоматическое отслеживание отдельных немеченых клеток сочетается с 3D-измерениями клеток для количественной оценки ряда имеющих отношение к ранам параметров клеток, включая скорость закрытия царапин.

Эксперименты по определению диапазона доз проводили с E4 (от  $10^{-10}$ М до  $10^{-6}$ М) и E2, с митомицином С (ММС, для ингибирования пролиферации) и без него, с использованием носителя в качестве отрицательного контроля.

#### *Фибробласты - результаты*

Используя широко проверенный *in vitro* анализ монослоя фибробластов методом зарастания царапины, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что E4 способствует закрытию ран *in vitro* в той же степени, что и E2, как на мышинных, так и на человеческих фибробластах (фигура 9А и В, соответственно). Анализ проводили в среде для культивирования клеток без фенолового красного, содержащей очищенную активированным углем фетальную бычью сыворотку, с использованием фибробластов, выделенных у самок мышей C57Bl/6 и из излишков кожи брюшной полости, отданных тремя донорами женского пола в возрасте 20, 49 и 57 лет.

#### *Кератиноциты - результаты*

Данные показывают, что влияние эстрогенов (E4 и E2) на миграцию кератиноцитов зависит от % НКГС (добавка для роста кератиноцитов человека), используемой в культуральной среде. Однако в условиях культивирования с 15% НКГС воздействие E4 ( $10^{-10}$ М и  $10^{-7}$ М) на кератиноциты, по-видимому, более сильное, чем воздействие E2 (фигура 10).

#### Эксперимент с иммунными клетками

Поляризацию иммунных клеток оценивали *in vitro* с использованием маркеров фенотипа M1/TH-1 (NOS2) и M2/TH-2 (ARG1) с человеческими моноцитами и мышинными моноцитами (BMDM, моноциты костномозгового происхождения).

#### *Протокол*

Человеческую кровь получали в соответствии с одобрением национального этического комитета с полным информированным письменным согласием пациента. Свежевыделенную человеческую кровь собирали в вакуумные пробирки с ЭДТА, разводили 1:1 в PBS и аккуратно наслаивали на гистопак (Merck). Пробирки немедленно центрифугировали при 100 g в течение 30 минут, и беловатый светлый слой, образовавшийся на границе раздела с гистопак, аспирировали и дважды промывали (центрифугировали при 100 g, 10 минут) стерильным PBS. Нетронутые классические (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup>) моноциты выделяли из клеток промытого светлого слоя с использованием набора Miltenyi Classical Monocyte Isolation Kit, колонок LS и сепаратора MidiMACs (Miltenyi). Выделенные клетки высевали в планшеты для тканевых культур, и стимулировали их дифференцировку с использованием PMA.

Проводили эксперимент для оценки противовоспалительных эффектов E4 или носителя (отрицательный контроль). Использовали методику кПЦР для оценки эффектов E2 и E4 на поляризацию иммунных клеток с использованием хорошо проверенного маркера провоспалительной (NOS2 для фенотипа M1/TH-1) и противовоспалительной (ARG1 для фенотипа M2/TH-2) активности.

#### *Результаты*

E4 продемонстрировал противовоспалительные эффекты, способствуя переключению мышиных BMDM (моноциты костномозгового происхождения) или человеческих моноцитов с подтипа M1 (провоспалительный) на подтип M2 (заживляющий). Результаты изображены на фигурах 11 A и B, соответственно.

#### **Пример 4: Влияние E4 на экспрессию генов кератиноцитов и фибробластов в модели заживления ран in vitro**

Заживляющие свойства E4 исследовали на уровне транскрипции путем изучения изменений экспрессии генов с помощью кПЦР-РВ. Использовали массивы кПЦР с 84 генами, ориентированные на процесс заживления ран. Эти массивы содержат гены, важные для трех фаз процесса заживления ран, включая факторы ремоделирования внеклеточного матрикса (ЕСМ), воспалительные цитокины и хемокины, а также факторы роста и основные сигнальные молекулы. Изменения в экспрессии генов интерпретировали в дермокосметическом контексте, для того чтобы подчеркнуть потенциальные преимущества E4 в отношении заживления ран.

#### *Обработка клеток*

После 24-часового посева в культуральные колбы площадью 25 см<sup>2</sup> (T25) клетки обрабатывали с помощью E4 в течение 15 ч. Условия культивирования были такими же, как те, которые использовали для теста царапины (смотри пример 2), и клетки обрабатывали с помощью E4 в отсутствие FBS/НКС. Плотность клеток, использованная для анализа экспрессии генов, была ниже, чем плотности клеток, использованные для тестов царапины: 15 800 клеток/см<sup>2</sup> для анализа экспрессии генов в отличие от 113 636 клеток/см<sup>2</sup> для кератиноцитов и 100 000 клеток/см<sup>2</sup> для фибробластов в культуральных вставках для анализа закрытия раны. Действительно, анализ экспрессии генов обычно проводят на не достигших слияния клетках (во время логарифмической фазы роста).

#### *Экстракция общей РНК*

В конце 15-часовой обработки с помощью 10<sup>-7</sup>М E4 или 0,1% этанола, используемого в качестве контроля, общую РНК экстрагировали с использованием набора Qiagen RNeasy (Qiagen). Клетки промывали холодным PBS и лизировали в специально

предназначенном для этого буфере, входящем в состав набора. Экстракцию проводили согласно рекомендациям поставщика. Собранные РНК хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### *Анализ целостности РНК*

Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометрического измерения (QIAxpert, Qiagen), и качество РНК анализировали с помощью капиллярного электрофореза (Agilent Bioanalyzer 2100 - Agilent RNA 6000 Nano Kit).

#### *Синтез кДНК*

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора «RT2 First Strand Kit» (Qiagen) из общей РНК в соответствии с инструкциями производителя.

#### *Количественная ПЦР с использованием массивов ПЦР RT2 Profiler*

Использовали способ кПЦР для количественной оценки изменений экспрессии специфических маркеров в популяциях кДНК. Массивы «RT2 Profiler PCR Array human wound healing» содержат специфические праймеры для 84 генов-мишеней.

Аmplификацию генов-мишеней проводили в соответствии с рекомендациями поставщика за счет «HotStart Taq DNA Polymerase» и применения SYBR Green в качестве способа обнаружения. SYBR Green представляет собой маркер, излучающий флуоресценцию после введения между парными основаниями нуклеиновых кислот. Таким образом, интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна количеству образующихся ампликонов.

КПЦР проводили с использованием системы ПЦР в реальном времени Quantstudio7 (Applied Biosystems) и ее программного обеспечения (программное обеспечение QuantStudio real time PCR Software v1.3, Applied Biosystems).

Данные, полученные для условий с обработкой E4 сравнивали с контролем этанолом в обоих типах клеток. Значения пороговых циклов (Ct) нормализовывали к среднему значению Ct нескольких домашних генов, присутствующих в массиве (указаны в таблице ниже). Максимальное пороговое значение Ct фиксировали на уровне 36 циклов, что означает, что значения Ct выше 36 не учитывали в анализе.

#### *Результаты*

Обработка кератиноцитов человека (таблица 7) или фибробластов (таблица 8) с помощью  $10^{-7}\text{M}$  E4 в течение 15 часов индуцировала определенные интересные пути, участвующие в различных фазах процесса заживления ран.

**Таблица 7: Список дифференциально экспрессируемых генов после 15 часов обработки человеческих эпидермальных кератиноцитов в культуре этетролом (E4) –** выражено как кратное изменение (Fold Change, FC) относительно контроля этанола: FC >1: увеличение – FC <1: уменьшение

ОБОЗНАЧЕНИЕ ГЕНА	НАЗВАНИЕ ГЕНА	FC	P- значение
TIMP1	Ингибитор металлопротеиназы 1	0,8949	0,0049
MMP2	Матриксная металлопротеиназа-2; коллагеназа IV типа 72 кДа; желатиназа	1,1434	0,0324
CXCL11	Мотив С-Х-С хемокина 11	0,5221	0,0491

**Таблица 8: Список дифференциально экспрессируемых генов после 15 часов обработки человеческих дермальных фибробластов в культуре эстетролом (Е4) – выражено как кратное изменение (FC) относительно контроля этанола: FC >1: увеличение – FC <1: уменьшение**

ОБОЗНАЧЕНИЕ ГЕНА	НАЗВАНИЕ ГЕНА	FC	P- значение
PTGS2	Простагландин G/H-синтаза 2	0,8706	0,0006
VTN	Витронектин	0,7652	0,0028
CXCL5	Мотив С-Х-С хемокина 5	0,5017	0,0043
MAPK1	Митоген-активируемая протеинкиназа 1	0,9284	0,0176
SERPINE1	Ингибитор активатора плазминогена 1	0,8516	0,0186
FGF2	Фактор роста фибробластов 2	0,8828	0,0203
WNT5A	Белок Wnt-5a	0,8930	0,0288
MMP7	Матриксная металлопротеиназа -7; матрилизин	1,1451	0,0321
CTGF	Член 2 семейства CCN	0,7643	0,0446
COL1A2	Цепь коллагена альфа-2(1)	0,9445	0,0466

Хотя эти различия в экспрессии генов немногочисленны и имеют низкую амплитуду, они позволяют предположить, что (по сравнению с контролем этанолом) Е4 может способствовать переключению между воспалительной фазой и фазами пролиферации/ремоделирования посредством понижающей регуляции провоспалительных факторов и стимуляции совмещенная системы MMP/TIMP.

Обработка человеческих фибробластов или кератиноцитов с помощью  $10^{-7}$ М Е4 в течение 15 часов значительно снижала экспрессию хемокинов, CXCL5 и CXCL11, циклооксигеназы 2 (PTGS2) и фактора роста фибробластов 2 (FGF2), усиливая переход в пролиферативную фазу.

#### **Пример 5: Доказательства антиоксидантных свойств Е4**

Цель данного исследования заключалась в изучении образования активных форм кислорода (ROS), индуцированного тестируемым объектом, эстетролом (E4), в клеточной линии лимфомы мыши L5178Y ТК<sup>+/-</sup>.

### Протокол

Клетки L5178Y ТК<sup>+/-</sup> в логарифмической фазе роста высевали в черные 96-луночные планшеты для культивирования клеток по  $1 \times 10^4$  клеток в 90 мкл среды для культивирования клеток. Контрольные образцы и тестируемый образец в трех повторностях наносили на клетки в виде 10-кратного концентрата в 10 мкл 10% раствора этанола в PBS (конечная концентрация этанола на планшете составляла 1%). Клетки инкубировали в течение 3 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, и генерацию ROS оценивали по флуоресценции с реагентом ROS: реагент ROS заново подготавливали путем растворения одной ампулы реагента (50 мкг) в 70 мкл DMSO и последующего его разбавления 2,1 мл предварительно нагретого PBS. В каждую лунку добавляли по 10 мкл реагента ROS, и планшет встряхивали в темноте в течение 30 секунд. Планшеты инкубировали приблизительно при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 ч. 30 мин., и считывали флуоресценцию на планшетном сканере с возбуждением на 492 нм и эмиссией на 520 нм.

Три эксперимента были проведены с отрицательным контролем лактатом (известно, что он не индуцирует ROS) и положительным контролем пероксидом водорода (известно, что он индуцирует ROS в клетках) в концентрациях вплоть до 100 мкМ и с тестируемым объектом в концентрациях 1, 10, 50, 100, 1000 и 3000 мкМ. Результаты индукции ROS для отрицательного контроля, положительного контроля и клеток, обработанных тестируемым объектом, сравнивали с результатами, полученными с контролем необработанным носителем.

### Результаты

Отрицательный контроль лактат не индуцировал ROS ни в одном эксперименте при концентрациях вплоть до 100 мкМ по сравнению с контролем носителем. Положительный контроль пероксид водорода показал тенденцию к увеличению уровней ROS после 3 ч. воздействия по сравнению с контролем носителем.

E4 вплоть до 3000 мкМ вызывал дозозависимое снижение уровней ROS, детектированных в клетках L5178Y ТК<sup>+/-</sup>, тогда как лактат вплоть до 100 мкМ не оказывал воздействия на индукцию ROS после 3 ч. воздействия.

### Вывод

E4 вызывал дозозависимое снижение ROS во всех трех экспериментах с наибольшим эффектом при самой высокой протестируемой концентрации 3000 мкМ, что позволяет предположить, что E4 действовал в этом исследовании как антиоксидант.

### **Пример 6: Органная культура волосяных фолликулов (модель ex vivo)**

12-44 полноразмерных лобно-височных волосяных фолликулов (HF) получали от четырех доноров-людей женского пола возраста >50 лет. Донорами были субъекты женского пола европейской внешности 59, 62, 59 и 67 лет соответственно (донор 1: 12 височных HF в анагене; донор 2: 29; донор 3: 44; донор 4: 32). После микродиссекции кожи, как описано (Edelkamp et al., *Methods Mol Biol*, 2020, 2154:105-119; и Langan et al., *Exp Dermatol*, 2015, Dec;24(12):903-1), HF помещали в подходящую культуральную среду и давали им период отдыха 24 ч., чтобы они могли восстановиться после травмы микродиссекции. Тестируемое вещество (или носитель (0,3% EtOH), или E4 в концентрациях 30 мкМ, 3 мкМ или 300 нМ) добавляли в среду в конце 24 ч. Общее время культивирования составляло 5-7 дней в зависимости от исследуемых параметров и задачи эксперимента. Дизайн эксперимента с органной культурой волосяных фолликулов изображен на фигуре 12. Более долгосрочные эксперименты с культурой можно использовать для анализа способности задерживать начало катагена.

Эта модель позволяет оценить, способна ли обработка E4 продлевать продолжительность анагена и/или задерживать начало катагена. Клинически выпадение волос связано с уменьшением HF в анагене или с укорочением продолжительности анагена. Таким образом, стимулирование анагена может ограничивать выпадение волос.

Были исследованы следующие параметры:

- **Удлинение стержней волос ex vivo (цифровой светлопольный микроскоп)**

Этот параметр отражает скорость роста HF, тем самым коррелируя с удлинением HF или образованием стержней волос.

Для определения длины HF каждый HF измеряли от конца соединительнотканной оболочки луковицы до конца дистальной внешней корневой оболочки (ORS) с использованием цифрового светового микроскопа при 50-кратном увеличении (VHX 900 Keyence Corporation, Osaka, Япония) и соответствующего программного обеспечения (Edelkamp et al., *Methods Mol Biol*, 2020, 2154:105-119; и Langan et al., *Exp Dermatol*, 2015, Dec;24(12):903-1). Измерения проводили на исходном уровне, после периода отдыха 24 ч. и впоследствии каждые 24-48 ч. в течение всего эксперимента. Удлинение выражается в миллиметрах роста и/или как процентная величина удлинения по сравнению с исходным измерением.

- **Пролиферация и апоптоз кератиноцитов матрицы волоса**

Кератиноциты герминативной матрицы волоса пролиферируют в основном во время анагена. Их пролиферация резко снижается во время перехода анаген/катаген и отсутствует

в позднем катагене (Langan et al., Exp Dermatol, 2015). Апоптоз кератиноцитов матрицы волоса используется как дополнительный индикатор перехода анаген/катаген.

Пролиферацию оценивали путем количественного определения процентной доли кератиноцитов матрицы волоса в четко определенной области (кератиноциты герминативной матрицы волоса, ниже линии Auber), которые были положительными по маркеру пролиферации Ki67 (или другому маркеру пролиферации, такому как BrdU или EdU), тогда как апоптоз оценивали с использованием иммунофлуоресценции TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick-end labelling, опосредованное TdT мечение ник-концов dUTP-биотином) (или другого маркера апоптоза, такого как активированная каспаза-3) в той же популяции кератиноцитов (ниже линии Auber) и в кератиноцитах прекортикальной матрицы волоса (выше линии Auber) (Langan et al., Exp Dermatol 2015) (фигура 13).

**• Макроскопическое и микроскопическое определение стадии цикла развития волоса и оценка цикла развития волоса**

Определение стадии цикла развития волоса и расчет оценки цикла развития волоса являются показателями прохождения цикла развития волоса и перехода анаген-катаген (Langan et al., Exp Dermatol, 2015). Определение стадии цикла развития волоса и оценку цикла развития волоса проводили в конце культивирования. Стадию цикла развития волоса каждого HF определяли по нескольким установленным макроскопическим и микроскопическим параметрам (Langan et al Exp Dermatol, 2015). Для макроскопической стадии цикла развития волоса получали светлопольные изображения живых HF с помощью цифрового микроскопа (Keyence VHX 900). Микроскопическое определение стадии цикла развития волоса проводили с использованием иммуногистологии Ki67/TUNEL и гистохимии по Массону-Фонтана. Анализ стадии цикла развития волоса проводили путем расчета процентной доли HF на каждой стадии цикла развития волоса. Оценку цикла развития волоса определяли путем присвоения условной оценки каждой стадии цикла развития волос следующим образом: анаген: 100, ранний катаген: 200, средний катаген: 300, поздний катаген: 400, дистрофическая 500, причем более высокая оценка является показателем большего количества HF в катагене.

Стадия цикла развития волоса	Анаген	Ранний катаген	Средний катаген	Поздний катаген	Дистрофическая (анаген/катаген)
Форма волосяной луковицы	Закругленная	В виде пули	Слегка треугольная, набухающая	Утонченная и удлинненная	Набухшая луковица, отделение эпителия от мезенхимальной ткани, спонгиоз в

					ORS
Форма и толщина матрицы волоса	Плотная закрытая матрица волоса	Более тонкая открывающаяся матрица волоса	Очень тонкая, укороченная	Очень тонкая, слегка втянутая	Как в анагене или катагене
Форма дермальной папиллы (DP)	Миндалевидная	Более округлая	Плотно упакованная и округлая	Очень плотно упакованная и округлая	Как в анагене или катагене
Накопление фибробластов в стебельке дермальной папиллы	нет	да	да	да	Как в анагене или катагене
Пигментация	Сильная пигментация начинается на уровне линии Auber и распространяется до половины матрица волоса	Более слабая пигментация начинается на уровне линии Auber или выше дермальной папиллы	Более слабая пигментация начинается выше дермальной папиллы	Более слабая пигментация начинается на уровне клубного волоса	Появление скоплений меланина
Пролиферация в герминативной матрице волоса	Выражена ниже линии Auber	Уменьшение количества пролиферирующих клеток ниже линии Auber	Нет пролиферации ниже линии Auber	Нет пролиферации ниже линии Auber	Как в анагене или катагене
Апоптоз в матрице волоса	Нет апоптоза в матрице волоса	Можно наблюдать небольшой апоптоз в матрице волоса	Апоптоз в матрице волоса и эпителиальной нити	Апоптоз в эпителиальной нити	Как в анагене или катагене

Фазы анагена и раннего катагена, а также репрезентативное изображение дистрофического волосяного фолликула, приведены на фигуре 14.

• **Высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH) в среду**

LDH высвобождается из цитоплазмы поврежденных клеток в культуральную среду. Таким образом, цитотоксичность средств можно оценивать на основе активности LDH, присутствующей в культуральной среде, с использованием колориметрического анализа (Cytotoxicity Detection Kit [LDH], Roche), как описано (Gherardini et al Int J Cosmet Sci, 2019, Apr;41(2):164-182). Измерения проводили на супернатантах, собранных в дни, соответствующие каждой культуре, и нормализованных по пустому образцу.

Для максимального высвобождения HF обрабатывали с помощью 1% Triton X 100 в среде носителя при 37° C в течение 30 минут, чтобы вызвать максимальное высвобождение LDH в среду.

• **Активность щелочной фосфатазы - индуктивность дермальной папиллы (DP)**

Щелочная фосфатаза является индикатором индуктивности DP (Yang, J Dermatol Sci, 2010, Jan;57(1):2-11). Активность щелочной фосфатазы *in situ* измеряли в DP.

• **Экспрессия версикана - индуктивность DP**

Версикан, большая молекула хондроитинсульфат протеогликана, экспрессируется в DP в HF в анагене, количество снижается в HF в катагене, и его экспрессия коррелирует с индуктивными свойствами волос. (Yang, J Dermatol Sci 2010). Анализировали интенсивность версикана в DP.

• **Экспрессия CD34 - потомство стволовых клеток**

CD34 представляет собой маркер, экспрессируемый потомством стволовых клеток области выступа HF. Он экспрессируется в самом внешнем слое внешней корневой оболочки (ORS) ниже перешейка (от области под выступом до супрабульбарной области) (Purba et al., BioEssays, 2014, May;36(5):513-25). Экспрессию CD34 и процентную долю CD34<sup>+</sup> клеток анализировали в супрабульбарной ORS.

• **Эмиграция фибробластов DP**

Резидентные фибробласты DP подвергаются миграции при переходе между анагенной и катагенной фазой (Hawkshaw et al., Journ of Invest Dermatol, 2015, 135(8):2129-2132). В начале катагена фибробласты DP эмигрируют в дермальную чашу через стебелек DP, тогда как при индукции анагена они иммигрируют обратно в DP. Таким образом, количественное определение количества фибробластов DP, присутствующих в стебельке DP и в DP (Клоеррег et al., Exp Dermatol, 2010, Mar;19(3):305-12), является прямым показателем индукции анагена или прохождения катагена. Экспрессия K15 - стволовые клетки.

• **Экспрессия K15 - стволовые клетки**

K15 представляет собой цитокератин типа I, экспрессируемый в стволовых клетках области выступа HF и их потомстве (Purba et al., BioEssays, 2014). Он экспрессируется в

области выступа, под областью выступа и в супрабульбарной ORS. Стволовые клетки области выступа идентифицируют по экспрессии K15, клеточной морфологии и анатомической локализации (ниже сальных желез, в области, где мышца, поднимающая волос, прикрепляется к HF). Экспрессию K15 анализировали в базальном слое области выступа и в супрабульбарной ORS, и пролиферацию K15-положительных клеток оценивали в сочетании с иммунофлуоресцентным окрашиванием Ki67.

#### *Статистика*

Каждая точка представляет собой один волосяной фолликул; Среднее значение  $\pm$  SEM; GraphPad Prism 9; обобщенный тест Д'Агостино-Пирсона на нормальность распределения; для групповых сравнений (#  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$ , ####  $p < 0,0001$ ), негауссово распределение (критерий Краскела-Уоллиса, критерий множественного сравнения Данна - каждый группа в сравнении с носителем), распределение по Гауссу (однофакторный ANOVA, критерий множественного сравнения Данна или Холма-Сидака - каждая группа в сравнении с носителем); парные сравнения (\*  $p < 0,05$ ), нет распределения по Гауссу (Манна-Уитни), распределение по Гауссу (t-критерий); н. з., не значительный. Статистику для негауссовского распределения отслеживали, если по меньшей мере одна группа не демонстрировала распределение по Гауссу внутри данной группы или попарного сравнения.

$n = 3-4$  донора, отдельные HF. Данные сначала анализировали в отношении распределения по Гауссу с использованием обобщенного теста Д'Агостино-Пирсона на нормальность распределения, и выбросы идентифицировали и удаляли с использованием способа ROUT ( $0 = 10/6$ ). Когда данные соответствовали распределению Гаусса, авторы настоящего изобретения выполняли однофакторный анализ ANOVA с последующим критерием множественного сравнения Холма-Сидака с фиксированным носителем и непарным t-критерием Стьюдента в сравнении с носителем. Когда данные были слишком малы, чтобы определить, соответствуют ли данные распределению Гаусса или данные не соответствуют распределению Гаусса, авторы настоящего изобретения выполняли критерий Краскела-Уоллиса с последующим критерием множественного сравнения Данна с фиксированным носителем и критерием Манна-Уитни в сравнении с носителем. Следует отметить, что оценки «только анаген» охватывают только данные  $n = 3$  пациентов. У донора 1 нет анагенных HF в группе носителя.

#### *Результаты*

- Все протестированные концентрации E4 не вызывали цитотоксичности HF (высвобождения LDH в среду) (фиг. 15).

- E4 не изменял выработку стержней волос (фиг. 16)

- Микроскопически 3 мкМ (значительно) и 300 нМ и 30 мкМ (на уровне тенденции) E4 пролонгировали анаген (фиг. 17).

- 3 мкМ (значительно) и 300 нМ и 30 мкМ (на уровне тенденции) E4 увеличивали пролиферацию кератиноцитов матрицы волоса, не влияя на апоптоз кератиноцитов матрицы волоса (фиг. 18).

- Все протестированные концентрации E4 на уровне тенденции повышали экспрессию версикана и активность щелочной фосфатазы в клетках DP (фиг. 19).

- Анализ эмиграции фибробластов DP показал, что все протестированные E4 не оказывали заметного влияния на плотность клеток в DP (фиг. 20), все концентрации на уровне тенденции снижали плотность клеток и 300 нМ и 3 мкМ E4 значительно снижали общее количество клеток в стебельке DP (фиг. 21), тогда как E4 не оказывал значительного влияния на плотность клеток в индуктивной дермальной чаше (фиг. 22).

- В базальном слое области выступа 3 мкМ E4 значительно снижали процентную долю K15-положительных клеток, тогда как 30 мкМ (значительно) и 3 мкМ и 300 нМ (на уровне тенденции) E4 увеличивали их пролиферацию (фиг. 23).

- В супрабульбарной ORS E4 не оказывал никакого влияния на процентную долю K15-положительных клеток, но 300 нМ (значительно) и 3 мкМ (на уровне тенденции) E4 уменьшали их пролиферацию (фиг. 24).

- 3 мкМ (значительно) и 300 нМ и 30 мкМ (на уровне тенденции) E4 увеличивали процентную долю CD34-положительных клеток в супрабульбарной ORS (фиг. 25).

#### *Обсуждение и выводы*

В представленных здесь экспериментах исследуется потенциальное влияние эстрогенного соединения E4 на цикл развития волос, кератиноциты матрицы волоса, индуктивность DP и эмиграцию фибробластов DP, сохранение и образование потомства стволовых клеток в контексте стимулирования роста волос. Эксперименты подтвердили, что протестированные концентрации E4 не вызывают цитотоксичности в отношении HF (высвобождения LDH в среду). Самое главное, данные от четырех отдельных доноров показали, что E4 на уровне тенденции (300 нМ и 30 мкМ) и значительно (3 мкМ) продлевает анаген *ex vivo*. Значительный эффект продления анагена у 3 мкМ E4 был дополнительно подтвержден снижением плотности клеток в стебельке DP, поскольку фибробласты DP накапливаются в этом конкретном компартменте во время их эмиграции из DP в катагене (Клоергер et al., *Exp Dermatol.* 2010). Эффект продления анагена был также подтвержден значительным увеличением пролиферации кератиноцитов матрицы волоса после обработки с помощью 3 мкМ E4.

Данные свидетельствуют о том, что эффект продления анагена со стороны E4 мог быть, по крайней мере частично, опосредован стимуляцией индуктивности фибробластов DP. Действительно, все протестированные концентрации E4, по-видимому, на уровне тенденции повышающе регулировали активность щелочной фосфатазы и экспрессию версикана в DP.

В области выступа 3 мкМ E4, по-видимому, на уровне тенденции увеличивают скорость пролиферации плюрипотентных стволовых клеток HF, при том, что они значительно снижают процентную долю K15-положительных клеток. Однако обработка благоприятно влияла на образование и/или активность потомства стволовых клеток в супрабульбарной ORS. В частности, 3 мкМ E4 на уровне тенденции снижали количество пролиферативных K15-положительных клеток и значительно увеличивали процентную долю CD34-положительных клеток, причем последнее также дополнительно подтверждает эффект продления анагена со стороны E4 (Purba et al., 2014).

В совокупности эти эксперименты еще больше побуждают к изучению обработки 3 мкМ E4 для стимуляции роста волос. E4 может иметь потенциал к поддержанию анагена и, возможно, предотвращению миниатюризации HF. Вышеописанные эксперименты повторены с использованием пораженных и непораженных терминальных и промежуточных микродиссекционированных полноразмерных HF от пациентов с FPHL (Female Pattern Hair Loss, выпадение волос по женскому типу). Ожидается положительный эффект от обработки с помощью E4.

#### **Пример 7: Клиническое исследование для оценки эффекта лечения эстетролом у женщин в период менопаузы (пери- и постменопаузы) на выпадение волос**

Начато рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы II (пилотное) для оценки эффектов эстетрола у женщин в период постменопаузы с андрогенетической алопецией и для оценки влияния на параметры волос.

##### **Дизайн исследования:**

Это рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы II (пилотное) состоит из двух частей: гинекологической и дерматологической части, которые проводят в 2 различных учреждениях, специализирующихся по соответствующей дисциплине.

Определение пригодности субъекта включает в себя классификацию типа выпадения волос с использованием шкалы плотности Савина. Субъекты будут случайным образом распределены в одну из 2 групп и будут получать либо 20 мг E4 в виде моногидрата, либо плацебо.

Исследования эффективности МНТ (Menopausal Hormone Therapy, гормональная терапия в менопаузе) будет включать в себя оценки метаболизма липидов и глюкозы и обновления костной ткани. Кроме того, улучшение будет оцениваться врачом в целом с использованием шкалы общего клинического впечатления (Clinical Global Impression, CGI).

Дерматологические исследования предусматривают количественные измерения волос, собственную оценку субъектом (Subject Self-Assessment, SSA) и общую оценку исследователем (Investigator's Global Assessment, IGA) роста волос. Кроме того, субъекты отвечают на опросник оценки качества жизни в период менопаузы (Menopause-Specific Quality of Life [MENQOL]) и дерматологический опросник качества жизни (индекс качества жизни при заболеваниях кожи, Dermatology Life Quality Index [DLQI]). Безопасность эстетрола (E4) оценивают на протяжении всего исследования у всех субъектов.

**Количество участников (запланированное):**

60 участников (группа 1: 30, группа 2: 30).

Этот размер выборки был определен для 5% двусторонней ошибки I рода и мощности 80% для детектирования разницы между группами в 20 волос на см<sup>2</sup> в числе волос в целевой области (ТАНС), в предположении, что стандартное отклонение составляет 25 волос на см<sup>2</sup>, при условии применения непараметрического подхода (Sauerbronn, *int J Gynaecol Obstet*, 2000, Jan;68(1):35-41).

**Переменные эффективности**

Переменные эффективности заместительной гормональной терапии при менопаузе (МНТ):

- Оценка влияния на метаболизм липидов и глюкозы и на обновление костной ткани по данным лабораторного исследования образцов крови натощак

- Оценка CGI

Кроме того, субъекты отвечают на опросник MENQOL.

**Переменные дерматологической эффективности:**

Дерматологические измерения и оценки проводят на исходном уровне (или при скрининге, или при следующем визите) и во время визитов (например, в недели 12 и 24; месяцы 4, 8 и 12).

Первичными переменными дерматологической эффективности будут:

- Число волос в целевой области (ТАНС),
- Оценка роста волос (Hair Growth Assessment, HGA).

Другие переменные будут рассматриваться как вторичные переменные.

Параметры волос будут оценивать с использованием следующих измерений:

**Анализ цифровых изображений** по стандартизированной макрофотографии

(HairMetrix Phototrichogram, Canfield) для количественного измерения волос:

Число волос в целевой области (ТАНС) и

Толщина волос в целевой области (ТАНВ) для непущковых и пушковых/подобных пушковым (миниатюризованных) волос отдельно.

Для облегчения стандартизированной макрофотографии выполняют татуировку микроточками на коже головы в исходном состоянии и во время одного или нескольких визитов.

**Стандартизированная общая фотография** для SSA и IGA с использованием общей фотографии кожи головы субъекта, сделанной в исходном состоянии с помощью программного обеспечения устройства Canfield Camera, и при ее сравнении с соответствующей общей фотографией в реальном времени, мгновенно доступной в программном обеспечении для обзора Canfield, установленном на поставляемом Canfield ноутбуке.

**Собственная оценка субъектом роста волос на коже головы** будет проводиться с помощью следующих 3 оценок:

Оценка роста волос (HGA) (Olsen EA, Whiting D, Bergfeld W, Miller J, Hordinsky M, Wanser R, et al. A multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of a novel formulation of 5% Minoxidil topical foam versus placebo in the treatment of androgenetic alopecia in men. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57:767-74).

Рост волос на коже головы сравнивают с исходным уровнем (визит X) с использованием следующей 7-бальной шкалы:

- [-3] сильно уменьшился
- [-2] умеренно уменьшился
- [-1] немного уменьшился
- [0] без изменений
- [1] немного увеличился
- [2] умеренно увеличился
- [3] сильно увеличился

для следующего утверждения:

- «Рост волос у меня на голове по сравнению с исходным уровнем: ...»

**Переменные эффективности: Индекс роста волос (Hair Growth Index, HGI):**

Индекс роста волос (HGI) (сравни Gubelin Harcha W, Barboza Martinez J, Tsai TF, Katsuoka K, Kawashima M, Tsuboi R, et al. A randomized, active- and placebo-controlled study of the efficacy and safety of different doses of dutasteride versus placebo and finasteride in the treatment of male subjects with androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70:489-98 e3).

Рост волос на коже головы сравнивают с исходным уровнем (визит X) по опроснику состояния здоровья с использованием следующей 7-бальной шкалы:

- [-3] намного меньше
- [-2] умеренно меньше
- [-1] немного меньше
- [0] тот же уровень
- [1] немного больше
- [2] умеренно больше
- [3] намного больше

по следующим 3 темам:

- «С начала лечения, когда я смотрю на свою область истончения, я могу видеть ... (кожи головы)».

- «С начала лечения мои волосы теперь покрывают ... (кожи головы)».

- «С начала лечения внешний вид (толщина/качество/количество) области истончения на моей голове ...».

Шкала удовлетворенности ростом волос (Hair Growth Satisfaction Scale, HGSS) (сравни Gubelin Harcha W, Barboza Martinez J, Tsai TF, Katsuoka K, Kawashima M, Tsuboi R, et al. A randomized, active- and placebo-controlled study of the efficacy and safety of different doses of dutasteride versus placebo and finasteride in the treatment of male subjects with androgenetic alopecia. J Am Acad Dermatol. 2014;70:489-98 e3).

Рост/внешний вид волос на коже головы сравнивают с исходным уровнем (визит X) с использованием следующей 7-бальной шкалы:

- [-3] очень недоволен
- [-2] недоволен
- [-1] в некоторой степени недоволен
- [0] нейтрально/ни удовлетворен, ни недоволен
- [1] в некоторой степени удовлетворен
- [2] удовлетворен
- [3] очень удовлетворен

по 5 темам, «Насколько по вашему мнению удовлетворительны ...»:

- Общий внешний вид ваших волос.

- Внешний вид области(ей) истончения в областях лечения на вашей голове.

- Количество видимой кожи головы в зонах лечения.

- Количество волос в зонах лечения.

- Рост волос в зонах лечения.

**Общая оценка исследователем (IGA) на коже головы** будет осуществляться с использованием следующей 7-бальной шкалы:

- [-3] сильно уменьшилась
- [-2] умеренно уменьшилась
- [-1] немного уменьшилась
- [0] без изменений
- [1] немного увеличилась
- [2] умеренно увеличилась
- [3] сильно увеличилась

Кроме того, субъекты могут отвечать на DLQI и Hairdex® (сравни Fischer TW, Schmidt S, Strauss B, Elsner P. Hairdex Ein Instrument zur Untersuchung der krankheitsbezogenen Lebensqualität bei Patienten mit Haarerkrankungen. Hautarzt., 2001 Mar;52 (3):219-27).

**Переменные безопасности:**

- Медицинская и гинекологическая история
- Физический осмотр
- Гинекологический осмотр
- Осмотр груди
- Дерматологическое обследование кожи в CRC
- Жизненно важные признаки
- Электрокардиограмма (ECG)
- Тест Папаниколау (PAP)
- Трансвагинальное ультразвуковое исследование (transvaginal ultrasound, TVUS)
- Маммография
- Лабораторные исследования:  
Забор крови натощак для
  - Гематологии/химии
  - Параметров липидов/глюкозы для включения
 Забор крови на:
  - Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и тиреотропный гормон (ТТГ) для включения
  - Тест мочи на беременность
- Предшествующее и сопутствующее лечение будут контролировать и наблюдать в течение всего периода исследования.
- Нежелательные явления (Adverse events, AE) будут контролировать и наблюдать в

течение всего периода исследования.

**Критерии включения:**

Субъекты будут направлены на лечение, если они соответствуют всем следующим критериям включения:

1. Подписанная и датированная письменная форма информированного согласия и любые требуемые разрешения на обработку персональных данных до начала любой процедуры исследования, после того как характер исследования был объяснен в соответствии с местными нормативными требованиями;

2. Женщины, в возрасте от  $\geq 40$  вплоть до  $\leq 65$  на момент скрининга;

3. Для субъектов с гистерэктомией: документально подтвержденная гистерэктомия должна быть проведена по меньшей мере за 6 недель до начала скрининга. Гистерэктомия может быть тотальной или субтотальной (то есть шейка матки не удалена);

4. Для субъектов без гистерэктомии: матка с толщиной двухслойного эндометрия  $\leq 4$  мм при по TVUS;

5. Обращение за лечением для облегчения VMS (vasomotor symptoms, вазомоторные симптомы), связанных с менопаузой;

6. Индекс массы тела от  $\geq 18,5$  кг/м<sup>2</sup> вплоть до  $\leq 35,0$  кг/м<sup>2</sup>;

7. Маммограмма, не выявившая признаков значительного заболевания, выполненная во время скрининга или в течение 9 месяцев до начала скрининга<sup>1</sup>;

8. Постменопаузальный статус, определяемый как любое из следующего:

a. Для без субъектов гистерэктомии:

- по меньшей мере 12 месяцев спонтанной аменореи

- или 6 месяцев спонтанной аменореи с уровнями ФСГ в сыворотке  $>40$  мМЕ/мл (значения, полученные после вымывания препаратов, содержащих эстроген/прогестин, если применимо, смотри критерии исключения 18 и 20)

- или 6 недель после хирургической двусторонней овариэктомии<sup>2</sup> с гистерэктомией или без нее;

b. Для субъектов с гистерэктомией:

- ФСГ в сыворотке  $>40$  мМЕ/мл (значения, полученные после вымывания содержащего эстроген/прогестин препарата, если применимо, смотри критерии исключения 18 и 20);

- или по меньшей мере 6 недель после хирургической двусторонней овариэктомии<sup>2</sup>;

9. Хорошее физическое и психическое здоровье по мнению исследователя на основании медицинской истории, физического и гинекологического обследования и клинических оценок, проведенных до визита 1;

10. Способность понимать и соблюдать протокольные требования, инструкции и ограничения, установленные протоколом;

11. Способность и готовность заполнять ежедневные исследовательские дневники и опросники.

12. Отказ от курения в течение по меньшей мере одного года (включая электронные сигареты).

Дополнительные критерии включения, учитывающие состояние кожи:

13. Уменьшение плотности волос на верхней части головы по сравнению с боковыми и задними частями головы, причем плотность волос на коже головы в области с измененной плотностью находится на стадиях от n. 2 до n. 6 по шкале плотности Савина.

14. Субъект готов сохранять одну и ту же прическу, длину волос и цвет волос на протяжении всего исследования субъект (подразумевается такой же интервал окрашивания волос до одобрения фотографий при скрининге/исходном состоянии).

15. Субъект согласен продолжать использовать другие свои обычные средства и режим ухода за волосами в течение всего исследования.

16. Субъект согласен сохранять прежние рацион питания и схему приема добавок.

<sup>1</sup>Для участия в исследовании субъекты должны иметь балл по Системе анализа и протоколирования данных визуализации молочных желез (Breast Imaging-Reporting And Data System, BI-RADS) 1 или 2. Неполный результат маммограммы, то есть BI-RADS 0, неприемлем и требует дальнейшей оценки. Учреждение должно получить копию официального отчета для документации исследования субъекта. Если маммографию проводят как часть данного исследования, следует получать цифровое изображение.

<sup>2</sup>Необходим отчет или информационное письмо на печатном бланке от врача субъекта, документально подтверждающие, что удалены оба яичника.

#### **Критерии исключения:**

Субъекты не будут направлены на лечение, если они соответствуют одному из следующих критериев исключения:

1. История злокачественного новообразования, за исключением базальноклеточной или неметастатической плоскоклеточной карциномы кожи, если диагноз был поставлен больше чем за 1 год до скринингового визита<sup>3</sup>;

2. Любые клинически значимые результаты, обнаруженные исследователем при обследовании молочной железы и/или маммографии, вызывающие подозрение о наличии злокачественное образование молочной железы, которые потребуют дополнительных клинических исследований для исключения рака молочной железы (однако, допускаются простые кисты, подтвержденные ультразвуковым исследованием);

3. Тест Папаниколау с атипичными плоскоклеточными клетками неопределенной значимости (atypical squamous cells undetermined significance, ASC-US) или выше (плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки низкой степени тяжести (lowgrade squamous intraepithelial lesion [LSIL]), атипичные плоскоклеточные клетки не могут исключать плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени тяжести (highgrade squamous intraepithelial lesion [HSIL]) [ASC-H], диспластические или злокачественные клетки HSIL) у субъектов с субтотальной гистерэктомией и без гистерэктомии<sup>4</sup>. Примечание: ASC-US допускается, если проведено рефлексное тестирование на вирус папилломы человека (human papilloma virus, HPV) и оно отрицательно в отношении онкогена HPV высокого риска подтипов 16 и 18;

4. Для субъектов без гистерэктомии:

- a. Наличие рака матки, гиперплазии эндометрия;
- b. Наличие полипа(ов) эндометрия;
- c. Недиагностированное вагинальное кровотечение или недиагностированное аномальное маточное кровотечение;
- d. Абляция эндометрия;
- e. Любые аномалии матки/эндометрия, которые, по мнению исследователя, являются противопоказанием к применению эстрогеновой и/или прогестиновой терапии. Сюда относятся наличие или история аденомиоза или значительной миомы;

5. Систолическое артериальное давление (blood pressure, BP) выше чем 139 мм рт. ст., диастолическое BP выше чем 89 мм рт. ст.<sup>5</sup> во время скрининга;

6. История венозных или артериальных тромбоэмболических заболеваний (например, тромбоза поверхностных или глубоких вен, тромбоэмболии легочной артерии, инсульта, инфаркта миокарда, стенокардии и так далее) или семейная история венозной тромбоэмболии (VTE) первой степени;

7. История известных приобретенных или врожденных коагулопатий или аномальных факторов свертывания крови, включая известные тромбофилии;

8. Лабораторные показатели глюкозы натощак выше 125 мг/дл и/или гликированного гемоглобина выше 7%<sup>6</sup>;

9. Дислиппротеинемия (LDL >190 мг/дл и/или триглицериды >300 мг/дл)<sup>7</sup>;

10. Наличие или история заболевания желчного пузыря, если не была выполнена холецистэктомия;

11. Системная красная волчанка;

12. Любые нарушения всасывания, включая операцию по шунтированию желудка;

13. История острого заболевания печени в течение предшествующих 12 месяцев до начала скрининга или наличие или история хронического или тяжелого заболевания печени [аланинтрансаминаза (ALT) или аспартаттрансаминаза (AST) > в 2 раза выше верхней границы нормы (upper limit of normal, ULN), билирубин >1,5 ULN], или опухоли печени;

14. Хроническая или текущая острая почечная недостаточность (оценочная скорость клубочковой фильтрации <60 мл/мин);

15. Положительный серологический результат на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатит В или С;

16. Порфирия;

17. Диагностика или лечение серьезного психического расстройства (например, шизофрении, биполярного расстройства и так далее) по решению исследователя;

18. Применение содержащего(их) эстроген/прогестин препарата(ов) вплоть до:

a. 1 недели до начала скрининга для несистемных гормональных средств для вагинального применения (колец, кремов, гелей);

b. 4 недель до начала скрининга для вагинальных или трансдермальных эстрогеновых или эстрогеновых/прогестиновых средств системного действия;

c. 8 недель до начала скрининга для пероральных эстрогеновых и/или прогестиновых средств и/или терапии селективными модуляторами эстрогеновых рецепторов;

d. 8 недель до начала скрининга для внутриматочной прогестиновой терапии;

e. 3 месяцев до начала скрининга для прогестиновых имплантатов или терапии инъекционными препаратами, содержащими только эстроген;

f. 6 месяцев до начала скрининга для терапии эстрогеновыми гранулами или терапии инъекционным прогестиновым препаратом;

19. Применение содержащих андроген/дегидроэпиандростерон (DHEA) препаратов:

a. 8 недель до начала скрининга для перорального, местного, вагинального или трансдермального андрогена;

b. 6 месяцев до начала скрининга для имплантируемой или инъекционной андрогеновой терапии;

20. Применение фитоэстрогенов или клопогона кистевидного для лечения VMS вплоть до 2 недель до начала скрининга;

21. Отсутствие готовности прекратить прием каких-либо гормональных средств, как описано в критериях исключения 18, 19 и 20, во время участия в исследовании;

22. Неадекватно леченная дисфункция щитовидной железы. Допускаются субъекты с низким или высоким уровнем ТТГ, если свободный тироксин (Т4) при скрининге находится в пределах нормы<sup>8</sup>.

23. История или наличие аллергии/непереносимости к исследуемому продукту или препаратам этого класса или любому его компоненту или история лекарственной аллергии или другой аллергии, которая, по мнению исследователя, является противопоказанием к участию субъекта;

24. История злоупотребления алкоголем или психоактивными веществами (включая марихуану, даже если это разрешено законом) или зависимости в течение предыдущих 12 месяцев до начала скрининга, как установлено исследователем на основе сообщенных наблюдений;

25. Спонсор или сотрудники CRO или сотрудники, находящиеся под непосредственным руководством исследователя и/или непосредственно участвующие в исследовании;

26. Субъекты с известной или предполагаемой историей клинически значимого системного заболевания, нестабильных медицинских расстройств, опасного для жизни заболевания или текущих злокачественных новообразований, которые, по мнению исследователя, могут представлять риск для субъекта;

27. Участие в другом клиническом исследовании исследуемого препарата в течение 1 месяца (30 дней) или получение исследуемого препарата в течение последнего месяца (30 дней) до начала скрининга;

28. Непригодность по любой причине по мнению исследователя.

Дополнительные критерии исключения, учитывающие влияние на состояние волос:

29. У субъекта есть какие-либо дерматологические заболевания кожи головы в целевой области, которые могут мешать применению ИМР или способа обследования, такие как грибковые или бактериальные инфекции, себорейный дерматит, псориаз, экзема, фолликулит, рубцы или атрофия кожи головы.

30. У субъекта есть какие-либо кожная патология или состояние, которые, по мнению исследователя, могут мешать оценке ИМР или требуют использования вмешивающейся местной, системной (например, при неконтролируемом заболевании щитовидной железы, определенных генетических нарушениях, которые воздействуют на рост волос или их распределение) или хирургической терапии.

31. У субъекта есть история или какие-либо признаки гиперандрогенемии (например, чрезмерный рост волос на лице/в области лобка/вокруг пупка, тяжелое акне, чрезмерные значения тестостерона в медицинской истории).

32. У субъекта есть текущая или недавняя история (в течение 6 месяцев) наращивания волос методом вплетения, использования недышащими париками или наращивания волос методом приклеивания.

33. У субъекта когда-либо была пересадка волос на коже головы.

34. У субъекта в истории или активно выпадение волос из-за диффузного телогенового эффувиума, гнездной алопеции, рубцовой алопеции, трихотилломании или состояний/заболеваний, отличных от AGA.

35. У субъекта есть текущая или недавняя история (в течение 6 месяцев) серьезных изменений диеты или веса или история расстройства (расстройств) пищевого поведения, любая история бариатрической хирургии (шунтирование желудка, рукавная резекция желудка, ушивание желудка); дефицит макро- или микроэлементов в течение последних 6 месяцев (то есть клинически значимые дефицит железа, дефицит белка, подтвержденные лабораторными исследованиями) и/или любой текущий диагноз мальабсорбционного заболевания (то есть целиакии, болезни раздраженного кишечника и так далее).

36. Субъект использовал любой из следующих местных препаратов или процедур на коже головы:

a) Местное лечение кожи головы для роста волос, включая миноксидил, гормональную терапию, антиандрогены или другие средства, о которых известно, что они влияют на рост волос, в течение 12 недель до исходного уровня (визит 2).

b) Местные безрецептурные (over-the-counter, OTC) или косметические средства для кожи головы, о которых известно или есть основания полагать, что они влияют на рост волос (например, такие бренды, как Maxilene, Nioxin, Foltene и так далее), или средства для здоровья или роста волос с пальмой сереноа, медью и так далее в течение 4 недель до исходного уровня (визит 2).

c) Местные средства для кожи головы, которые могут оказывать вспомогательное воздействие на рост волос, включая, но без ограничения, кортикостероиды, пимекролимус, такролимус и ретиноиды в течение 4 недель до исходного уровня (визит 2).

d) Процедуры для кожи головы (хирургическое, лазерное, световое или энергетическое лечение, микронидлинг и так далее) в течение 6 месяцев до исходного уровня (визит 2).

e) Процедура с обогащенной тромбоцитами плазмой (Platelet rich plasma, PRP) на коже головы в течение 1 года.

37. Субъект использовал следующие системные лекарственные средства или процедуры:

a) Бета-блокаторы, циметидин, диазоксид или кортикостероиды (включая внутримышечные и внутривенные инъекции) в течение 12 недель от визита 2/исходного уровня. Ингаляционные, интраназальные или глазные кортикостероиды разрешены при стабильном применении [определяется как дозы и частота, неизменные в течение по

меньшей мере 4 недель до исходного уровня (визит 2)].

b) Прием ретиноидов, изотретиноина, витамина А выше 10000 МЕ в день или терапия циклоспорином в течение 6 месяцев до исходного уровня (визит 2).

c) Любые лекарственные средства с 5-альфа-редуктазой (то есть финастерид (Propecia® и так далее), дутастерид или аналогичный(ые) продукт(ы)) в течение 12 месяцев до исходного уровня (визит 2).

d) Химиотерапию или цитотоксические средства в течение последних 5 лет.

e) Облучение кожи головы в любой момент времени.

f) Антиандрогены в течение 6 месяцев до исходного уровня (визит 2); Антиандрогены (ципротерона ацетат, хлормадинона ацетат и так далее) допустимы вместе с противозачаточными пилюлями при стабильном применении [определяется как дозы и частота, неизменные в течение по меньшей мере 3 месяцев до исходного уровня (визит 2)].

g) Другую системную терапию, которая, по мнению исследователя, может существенно повлиять на волосы или рост волос субъекта, включая, но без ограничения, средства для роста волос или здоровья волос со спиринолактоном, витаминами (включая прием биотина >5 мг/день) или гомеопатическими добавками или другие стероидные гормоны (в любой форме), включая анаболические стероиды, в течение 3 месяцев до исходного уровня (визит 2) или во время исследования.

<sup>3</sup> Исключением является только базально-клеточная карцинома или немеланомная плоскоклеточная карцинома кожи, если любая из них была диагностирована более чем за один год до скрининга субъекта.

<sup>4</sup> Как указано в письменной документации предварительного теста, проведенного в течение 18 месяцев до скрининга, или теста, проведенного во время скрининга.

<sup>5</sup> Измерения ВР при скрининге можно повторять, если значения выходят за рамки критериев включения, после дополнительных 5–10 минут сидения. Последнее показание будет использоваться для определения права на участие. Субъекты с легкой и умеренной гипертензией, которые находятся под контролем на стабильной антигипертензивной терапии, могут быть включены в исследование, если они соответствуют всем критериям включения/исключения. Субъекты, принимающие содержащие метилдопу или клонидин антигипертензивные препараты, не будут включены.

<sup>6</sup> Следует учитывать лабораторные показатели глюкозы натощак и гликированного гемоглобина, оцененные в течение последних 6 месяцев и во время отмывания и скрининга.

<sup>7</sup> Субъекты, получающие липидснижающую терапию, должны получать стабильную дозу в течение по меньшей мере 1 месяца до скрининга.

<sup>8</sup> Рефлексный тест на Т4 следует проводить при скрининге только в том случае, если

ТТГ при скрининге находится за пределами нормального диапазона.

**Статистические методы:**

Анализы будут проведены для популяции с назначенным лечением и популяции, выполнившей протокол. Категориальные факторы будут суммированы с использованием частот и/или процентных долей, тогда как непрерывные показатели будут описаны с использованием средних значений и стандартных отклонений.

Для нормально распределенных данных значимость изменения внутри группы по сравнению с исходным уровнем будет оценена по t-распределению Стьюдента, а сравнение изменений по сравнению с исходным уровнем между группами будет выполнено с использованием независимых t-критериев. Результаты будут представлены как среднее значение и 95% доверительный интервал. Для ненормально распределенных данных будут использованы эквивалентные непараметрические методы: знаковый критерий Уилкоксона для внутригруппового изменения от исходного уровня и U-критерий Манна-Уитни для сравнения между группами. Результаты будут представлены как медиана, минимум и максимум.

Анализы будут проведены с использованием программного обеспечения SAS (Stat версии 15.2; SAS Institute, Cary, NC, США) с уровнем значимости 0,05. В этом поисковом исследовании для проверки концепции не будет произведена корректировка на множественность тестирования.

## **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Единица дозирования для перорального введения, содержащая эстетрольный компонент в количестве, эквивалентном от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг эстетрола для применения в предотвращении или лечении выпадения волос.

2. Способ предотвращения или лечения выпадения волос, предусматривающий пероральное введение композиции, содержащей от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг эстетрольного компонента.

3. Применение эффективного количества эстетрольного компонента при производстве композиции или лекарственного средства для предотвращения или лечения выпадения волос, причем эстетрольный компонент применяют в количестве, эквивалентном от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг эстетрола.

4. Единица дозирования для перорального введения для применения по п. 1, способ по п. 2 или применение по п. 3, причем упомянутое предотвращение или лечение приводит к улучшению или поддержанию текстуры, качества и/или внешнего вида волос, причем, предпочтительно, упомянутое лечение предусматривает или приводит к улучшению числа волос в целевой области (ТАНС) и/или толщины волос в целевой области (ТАНВ).

5. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-3, причем упомянутое предотвращение или лечение включает в себя предотвращение выпадения волос, обращение вспять выпадения волос, замедление выпадения волос, уменьшение выпадения волос или усиление роста волос.

6. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-5, причем упомянутое выпадение волос представляет собой гормонально обусловленное выпадение волос, более предпочтительно выпадение волос, вызванное менопаузальным нарушением гормональной регуляции, таким как истощение эстрогенов, предпочтительно выпадение волос по женскому типу или андрогенетическую алопецию (AGA).

7. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-6, причем упомянутое предотвращение или лечение

увеличивает функцию и/или рост кератиноцитов и, в связи с этим, увеличивает функцию и/или рост, предпочтительно, эпидермальных кератиноцитов (КС), таких как находящиеся в области выступа, внешней корневой оболочке (ORS) или волосяной луковице.

8. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-7, причем упомянутое предотвращение или лечение увеличивает функцию и/или рост мезенхимальных фибробластов волосяного фолликула и, в связи с этим, увеличивает функцию и/или рост клеток дермальной папиллы (DP).

9. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-8, причем упомянутое предотвращение или лечение подразумевает задержку начала или предотвращение катагена.

10. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-9, причем упомянутое предотвращение или лечение подразумевает стимулирование и/или продление анагена.

11. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-10, причем упомянутое предотвращение или лечение подразумевает восстановление и/или стимулирование эпителиально-мезенхимального взаимодействия между клетками волосяного фолликула.

12. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-11, причем упомянутое предотвращение или лечение характеризуется уменьшением воспаления и/или окислительного стресса в волосяных фолликулах.

13. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-12, причем вводят ежедневное количество, эквивалентное от приблизительно 14 мг до приблизительно 21 мг эстетрола, предпочтительно количество от приблизительно 14 мг до приблизительно 16 мг или от приблизительно 19 мг до приблизительно 21 мг эстетрола.

14. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-13, причем упомянутый эстетрольный компонент

представляет собой эстетрол или его сложный эфир, причем, предпочтительно, упомянутый эстетрольный компонент представляет собой моногидрат эстетрола.

15. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-14, причем прогестаген не содержится в упомянутой единице дозирования, или причем прогестаген не используют или не вводят совместно.

16. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-14, причем в единице дозирования для перорального введения присутствует прогестаген, или причем используют, совместно вводят или вводят после лечения с помощью эстетрола прогестаген, предпочтительно выбранный из группы, содержащей: прогестерон, дроспиренон, норэтистерон, норэтистерона ацетат (NETA), норэтиндрон, дидрогестерон, левоноргестрел (LNG), этногестрел, норгестрел, номегестрол, номегестрола ацетат (NOMAC), тримегестон, несторон, дидрогестерон, гестоден, дезогестрел, норгестимат, ципротерона ацетат, диеногест и хлормадион, причем, более предпочтительно, упомянутый прогестаген выбирают из группы, содержащей дроспиренон, прогестерон или дидрогестерон.

17. Единица дозирования для перорального введения для применения или способ по п. 16, причем упомянутый прогестаген присутствует в упомянутой единице дозирования для перорального введения, или его используют, или вводят совместно, или вводят в количестве, эквивалентном от приблизительно 1 до приблизительно 4 мг, более предпочтительно от приблизительно 0,25 до приблизительно 4 мг, таком как от приблизительно 1 до приблизительно 3 мг, от приблизительно 2,5 до 3,5 мг дроспиренона, или причем упомянутый прогестаген вводят в количестве, эквивалентном от приблизительно 2,5 до 3,5 мг дроспиренона.

18. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ по любому из пп. 1-17, причем дополнительный активный ингредиент, подходящий для предотвращения или лечения выпадения волос, присутствует в единице дозирования для перорального введения, или причем дополнительный активный ингредиент, подходящий для предотвращения или лечения выпадения волос, совместно вводят или вводят до или после лечения с помощью эстетрола.

19. Единица дозирования для перорального введения для применения или способ по любому из пп. 1-18, причем композицию составляют в виде единицы дозирования для перорального введения, причем, предпочтительно, композицию составляют для перорального, сублингвального, буккального или сублабиального введения.

20. Единица дозирования для перорального введения для применения или способ по любому из пп. 1-19, причем единицу дозирования для перорального введения составляют так, чтобы она соответствовала единице дозирования для ежедневного введения, или, соответственно, вводят как единицу дозирования для ежедневного введения.

## **ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Единица дозирования для перорального введения, содержащая эстетрольный компонент в количестве, эквивалентном от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг эстетрола для применения в предотвращении или лечении выпадения волос по женскому типу или женской андрогенетической алопеции.

2. Способ предотвращения или лечения выпадения волос по женскому типу или женской андрогенетической алопеции, предусматривающий пероральное введение композиции, содержащей от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг эстетрольного компонента.

3. Применение эффективного количества эстетрольного компонента при производстве композиции или лекарственного средства для предотвращения или лечения выпадения волос по женскому типу или женской андрогенетической алопеции, причем эстетрольный компонент применяют в количестве, эквивалентном от приблизительно 10 мг до приблизительно 25 мг эстетрола.

4. Единица дозирования для перорального введения для применения по п. 1, способ по п. 2 или применение по п. 3, причем упомянутое предотвращение или лечение приводит к улучшению или поддержанию текстуры, качества и/или внешнего вида волос, причем, предпочтительно, упомянутое лечение предусматривает или приводит к улучшению числа волос в целевой области (ТАНС) и/или толщины волос в целевой области (ТАНВ).

5. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-3, причем упомянутое предотвращение или лечение включает в себя предотвращение выпадения волос, обращение вспять выпадения волос, замедление выпадения волос, уменьшение выпадения волос или усиление роста волос.

6. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-5, причем упомянутое предотвращение или лечение увеличивает функцию и/или рост кератиноцитов и, в связи с этим, увеличивает функцию

и/или рост, предпочтительно, эпидермальных кератиноцитов (КС), таких как находящиеся в области выступа, внешней корневой оболочке (ORS) или волосяной луковице.

7. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-6, причем упомянутое предотвращение или лечение увеличивает функцию и/или рост мезенхимальных фибробластов волосяного фолликула и, в связи с этим, увеличивает функцию и/или рост клеток дермальной папиллы (DP).

8. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-7, причем упомянутое предотвращение или лечение подразумевает задержку начала или предотвращение катагена.

9. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-8, причем упомянутое предотвращение или лечение подразумевает стимулирование и/или продление анагена.

10. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-9, причем упомянутое предотвращение или лечение подразумевает восстановление и/или стимулирование эпителиально-мезенхимального взаимодействия между клетками волосяного фолликула.

11. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-10, причем упомянутое предотвращение или лечение характеризуется уменьшением воспаления и/или окислительного стресса в волосяных фолликулах.

12. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-11, причем вводят ежедневное количество, эквивалентное от приблизительно 14 мг до приблизительно 21 мг эстетрола, предпочтительно количество от приблизительно 14 мг до приблизительно 16 мг или от приблизительно 19 мг до приблизительно 21 мг эстетрола.

13. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-12, причем упомянутый эстетрольный компонент представляет собой эстетрол или его сложный эфир, причем, предпочтительно, упомянутый эстетрольный компонент представляет собой моногидрат эстетрола.

14. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-13, причем прогестаген не содержится в упомянутой единице дозирования, или причем прогестаген не используют или не вводят совместно.

15. Единица дозирования для перорального введения для применения, способ или применение по любому из пп. 1-13, причем в единице дозирования для перорального введения присутствует прогестаген, или причем используют, совместно вводят или вводят после лечения с помощью эстетрола прогестаген, предпочтительно выбранный из группы, содержащей: прогестерон, дроспиренон, норэтистерон, норэтистерона ацетат (NETA), норэтиндрон, дидрогестерон, левоноргестрел (LNG), этногестрел, норгестрел, номегестрол, номегестрола ацетат (NOMAC), тримегестон, несторон, дидрогестерон, гестоден, дезогестрел, норгестимат, ципротерона ацетат, диеногест и хлормадион, причем, более предпочтительно, упомянутый прогестаген выбирают из группы, содержащей дроспиренон, прогестерон или дидрогестерон.

16. Единица дозирования для перорального введения для применения или способ по п. 15, причем упомянутый прогестаген присутствует в упомянутой единице дозирования для перорального введения, или его используют, или вводят совместно, или вводят в количестве, эквивалентном от приблизительно 1 до приблизительно 4 мг, более предпочтительно от приблизительно 0,25 до приблизительно 4 мг, таком как от приблизительно 1 до приблизительно 3 мг, от приблизительно 2,5 до 3,5 мг дроспиренона, или причем упомянутый прогестаген вводят в количестве, эквивалентном от приблизительно 2,5 до 3,5 мг дроспиренона.

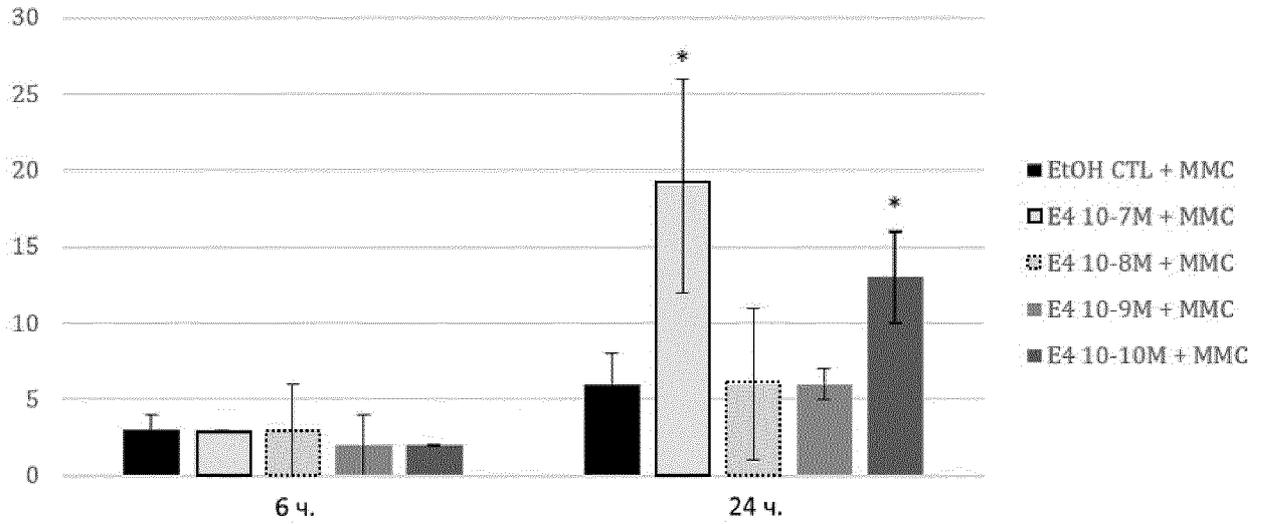
17. Единица дозирования для перорального введения для применения, применение или способ по любому из пп. 1-16, причем дополнительный активный ингредиент, подходящий для предотвращения или лечения выпадения волос, присутствует в единице дозирования для перорального введения, или причем дополнительный активный ингредиент, подходящий для предотвращения или лечения

выпадения волос, совместно вводят или вводят до или после лечения с помощью эстетрола.

18. Единица дозирования для перорального введения для применения или способ по любому из пп. 1-17, причем композицию составляют в виде единицы дозирования для перорального введения, причем, предпочтительно, композицию составляют для перорального, сублингвального, буккального или сублабиального введения.

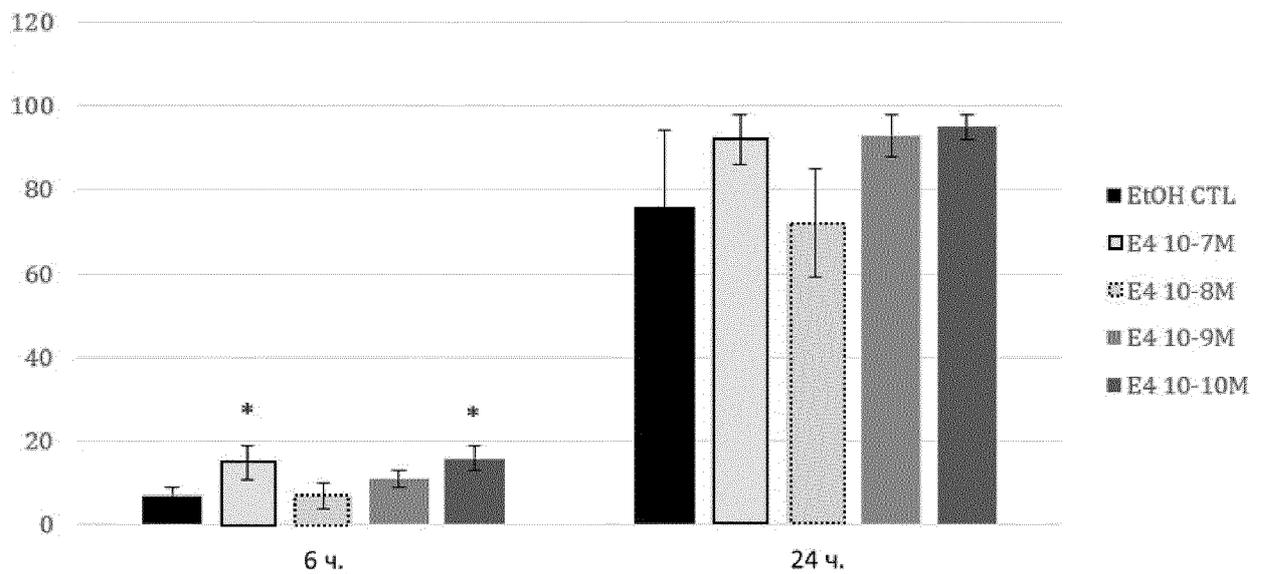
19. Единица дозирования для перорального введения для применения или способ по любому из пп. 1-18, причем единицу дозирования для перорального введения составляют так, чтобы она соответствовала единице дозирования для ежедневного введения, или, соответственно, вводят как единицу дозирования для ежедневного введения.

Покрывание бесклеточной области  
(% относительно бесклеточной области при t=0 ч.)



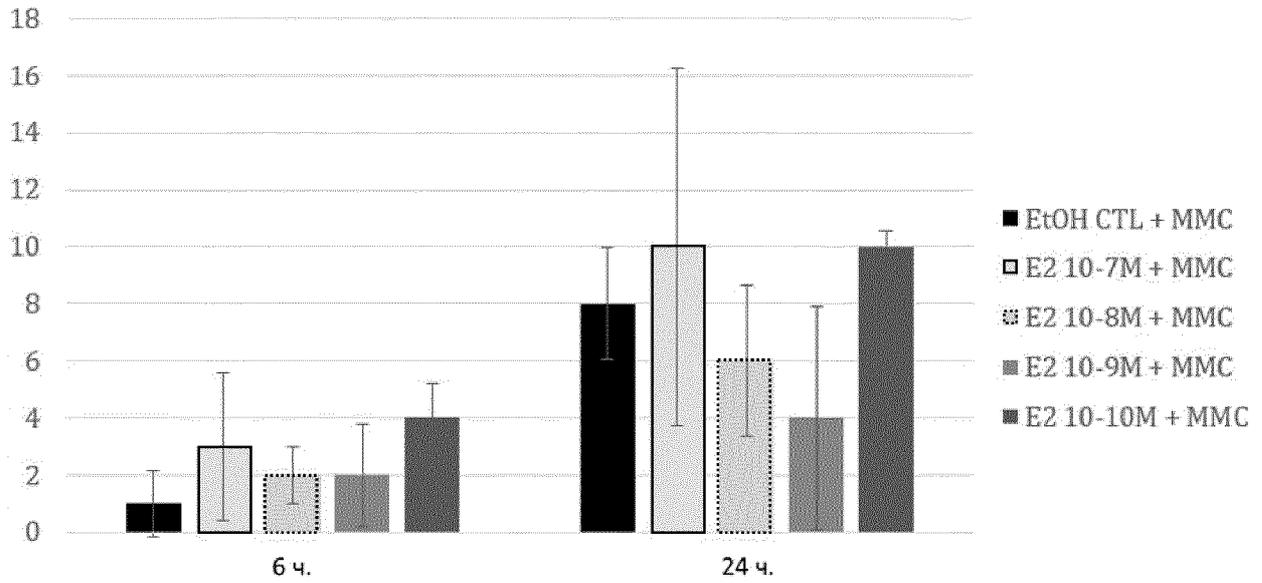
Фиг. 1

Покрывание бесклеточной области  
(% относительно бесклеточной области при t=0 ч.)



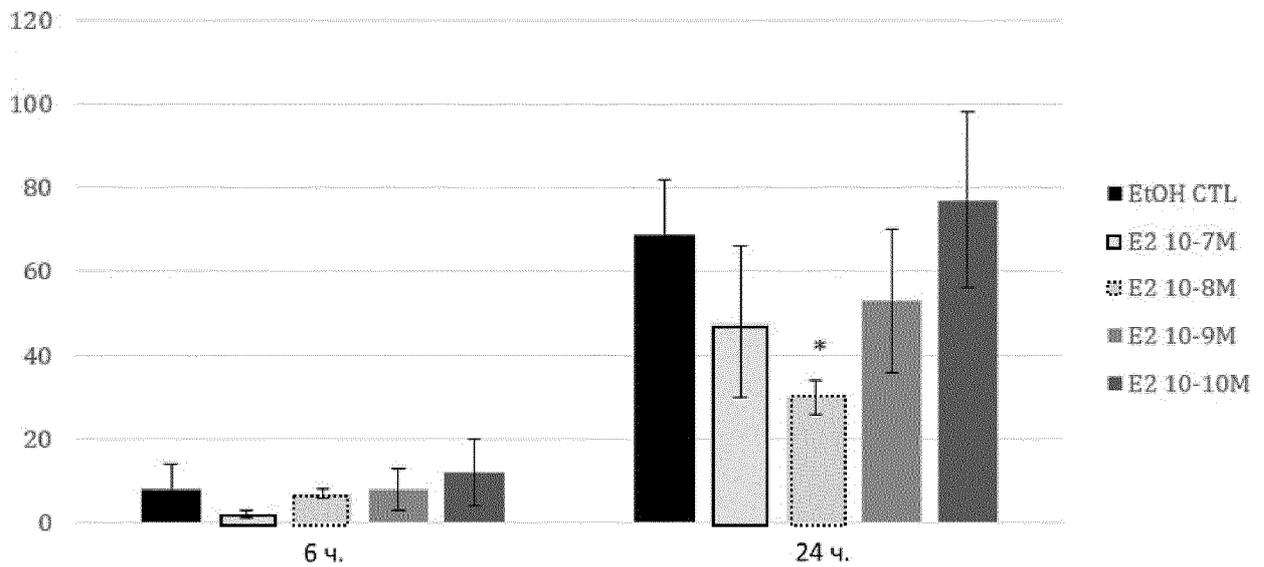
Фиг. 2

Покрывание бесклеточной области  
(% относительно бесклеточной области при t=0 ч.)



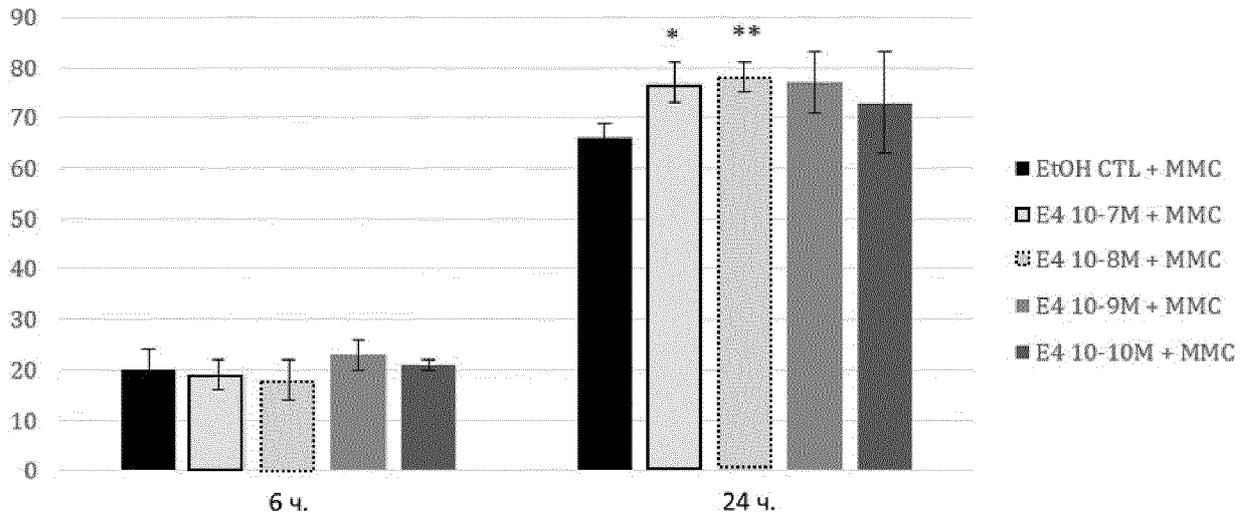
Фиг. 3

Покрывание бесклеточной области  
(% относительно бесклеточной области при t=0 ч.)



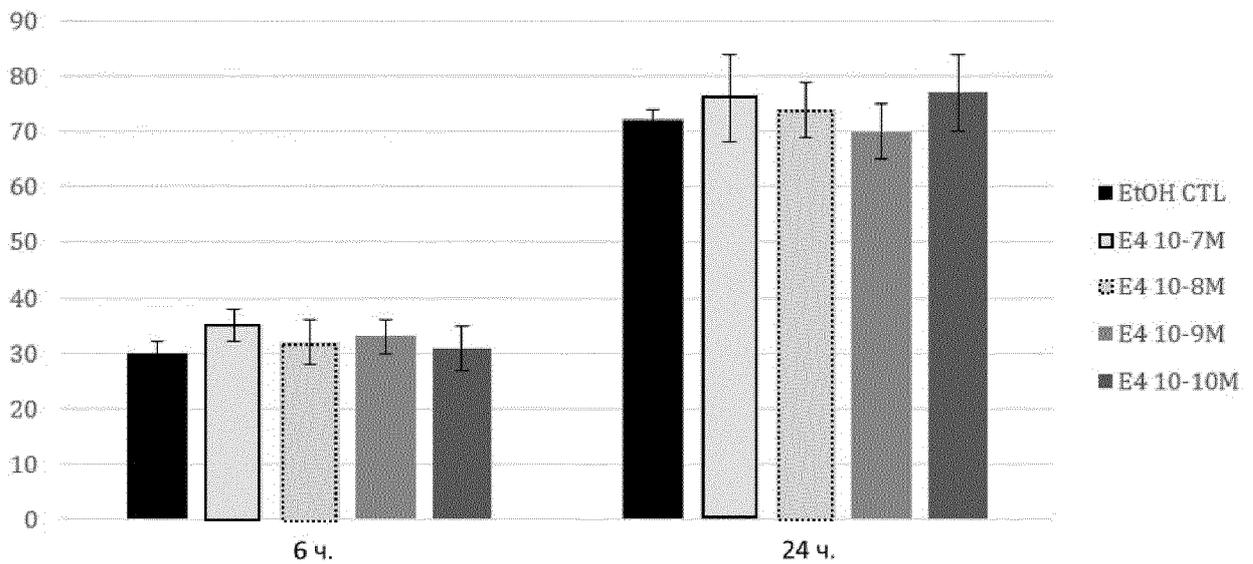
Фиг. 4

Покрывание бесклеточной области  
(% относительно бесклеточной области при t=0 ч.)



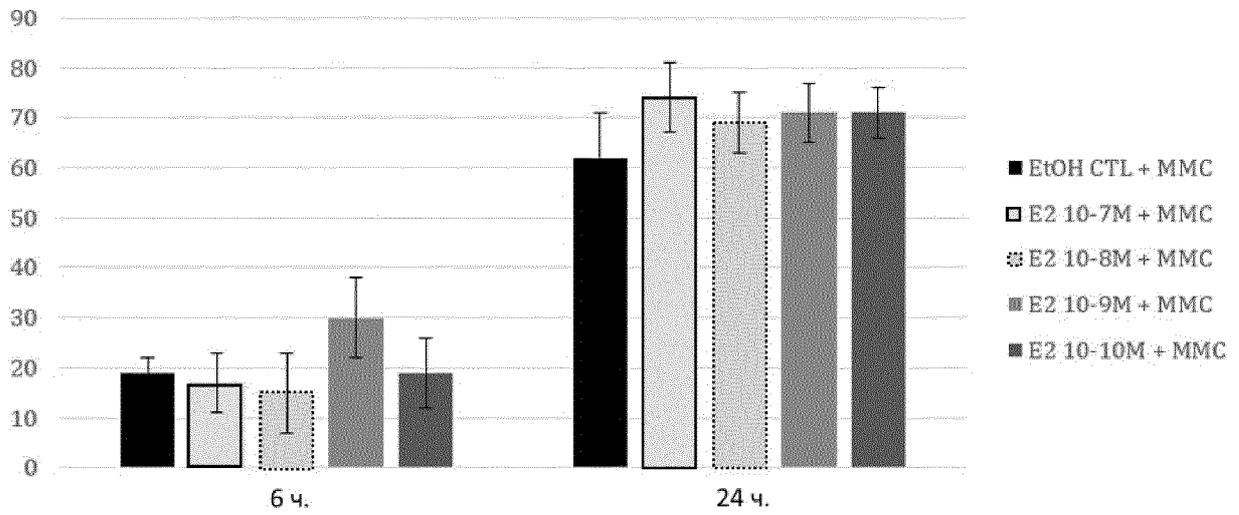
Фиг. 5

Покрывание бесклеточной области  
(% относительно бесклеточной области при t=0 ч.)



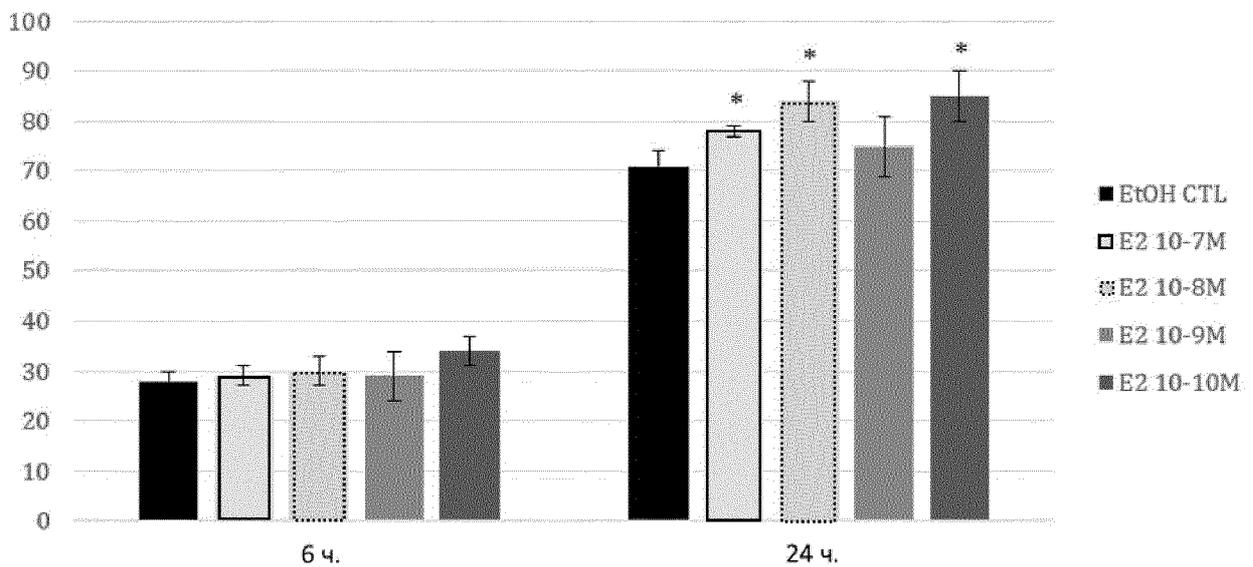
Фиг. 6

Покрытие бесклеточной области  
(% относительно бесклеточной области при t=0 ч.)

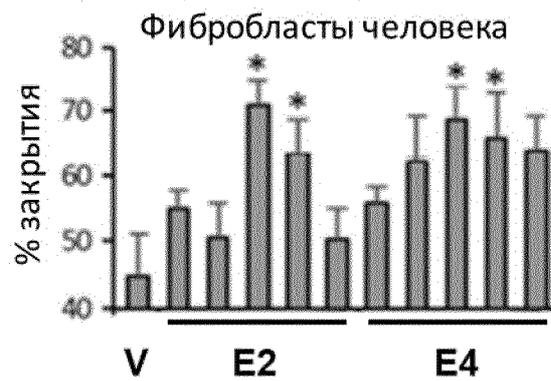
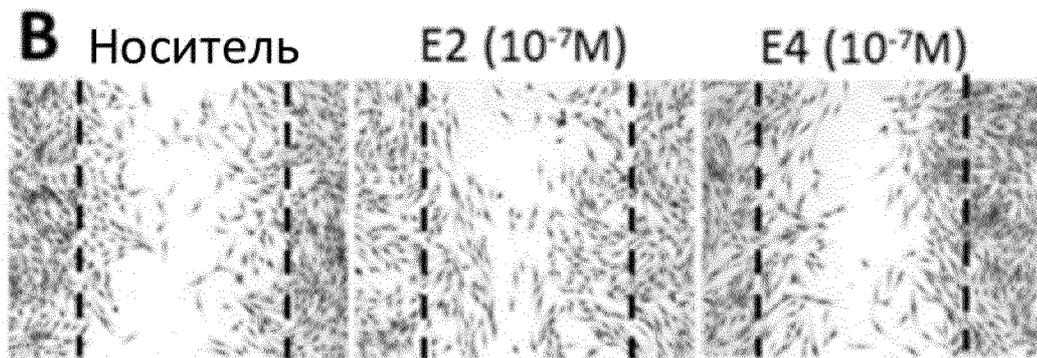
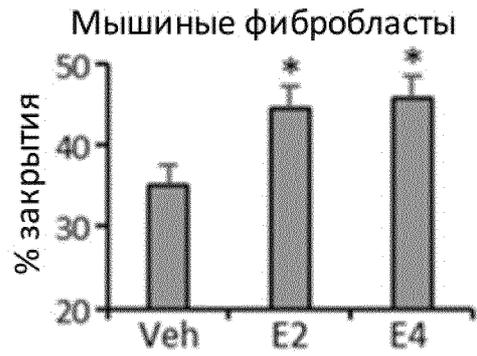
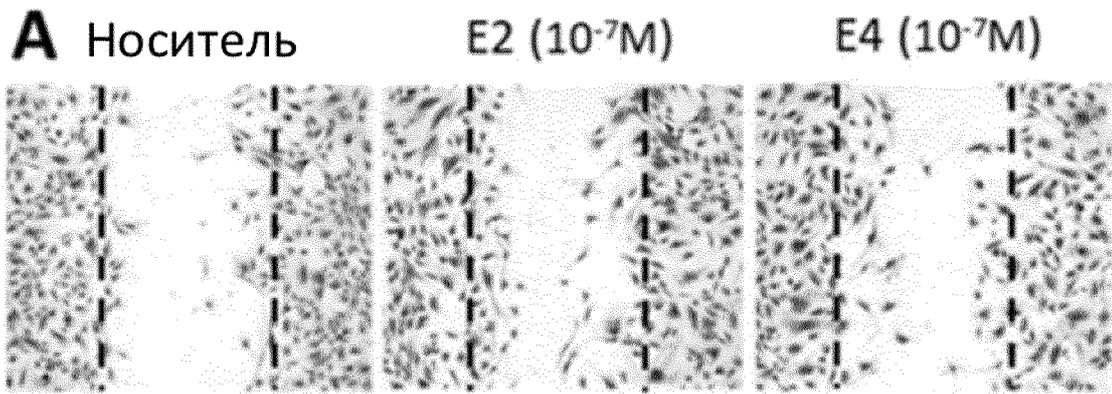


Фиг. 7

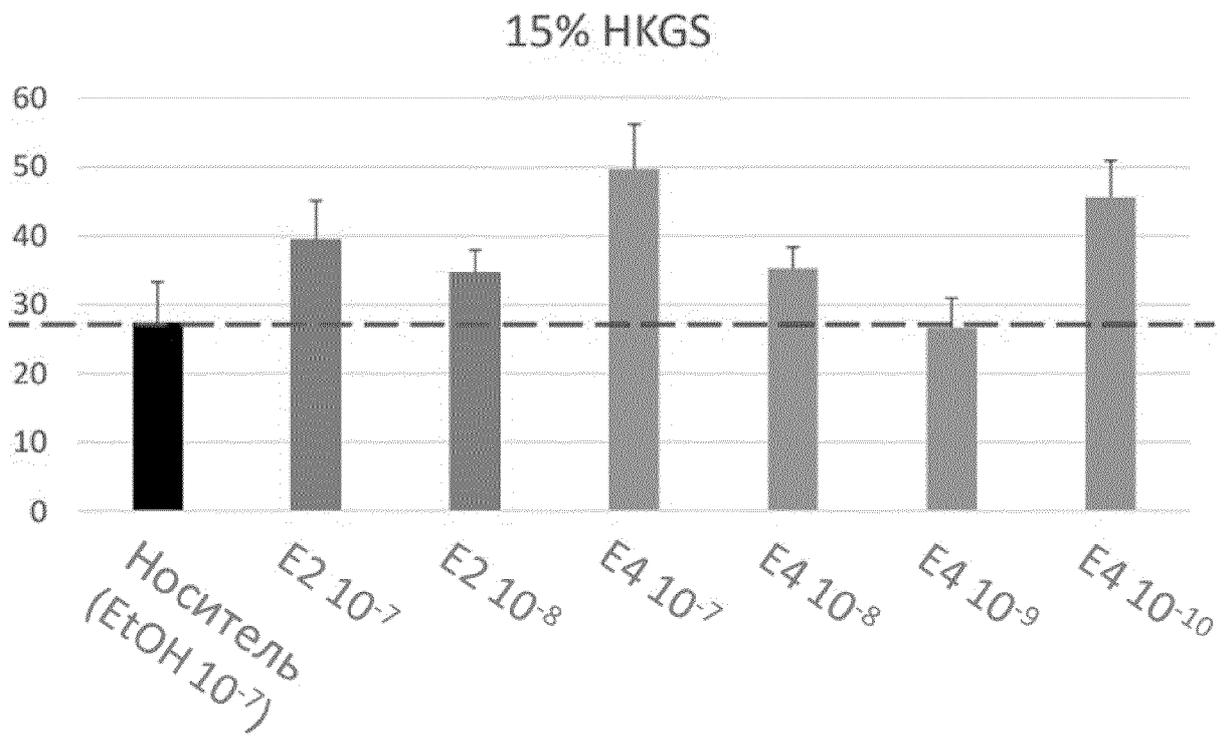
Покрытие бесклеточной области  
(% относительно бесклеточной области при t=0 ч.)



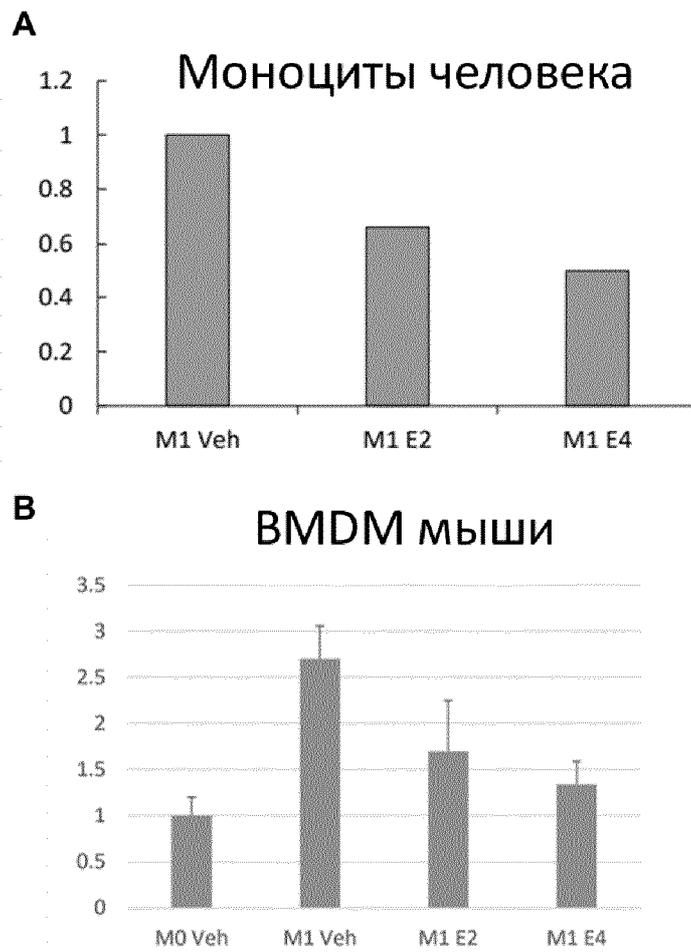
Фиг. 8



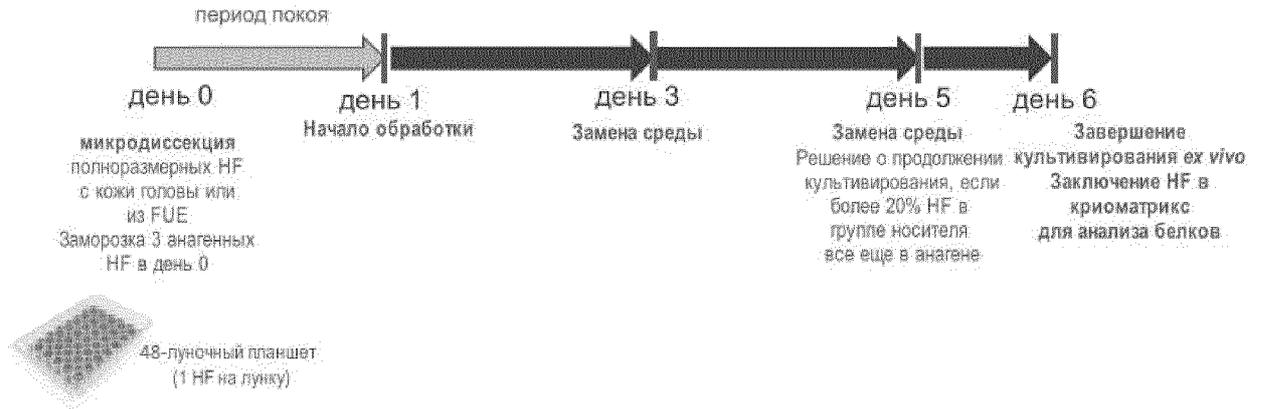
Фиг. 9



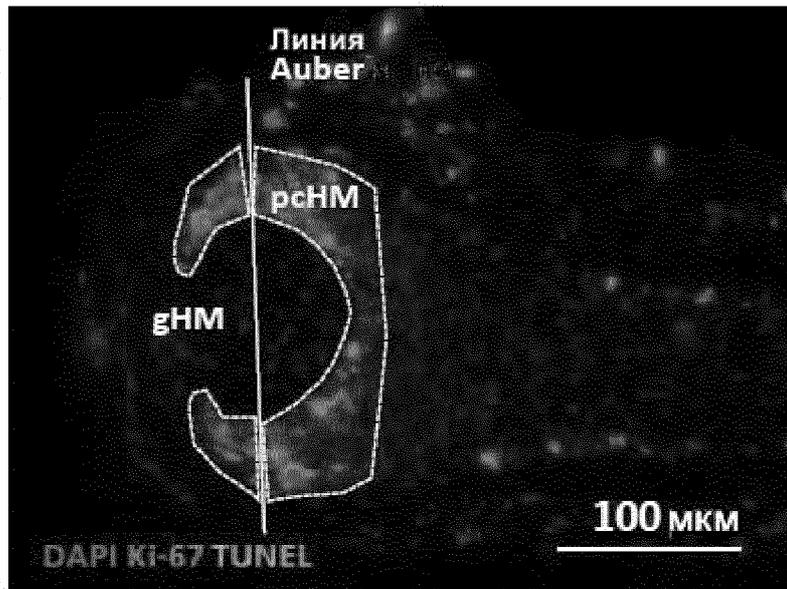
Фиг. 10



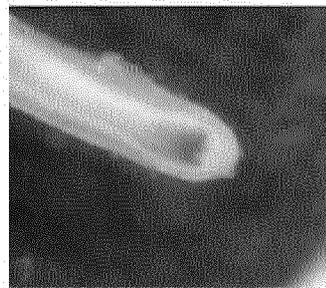
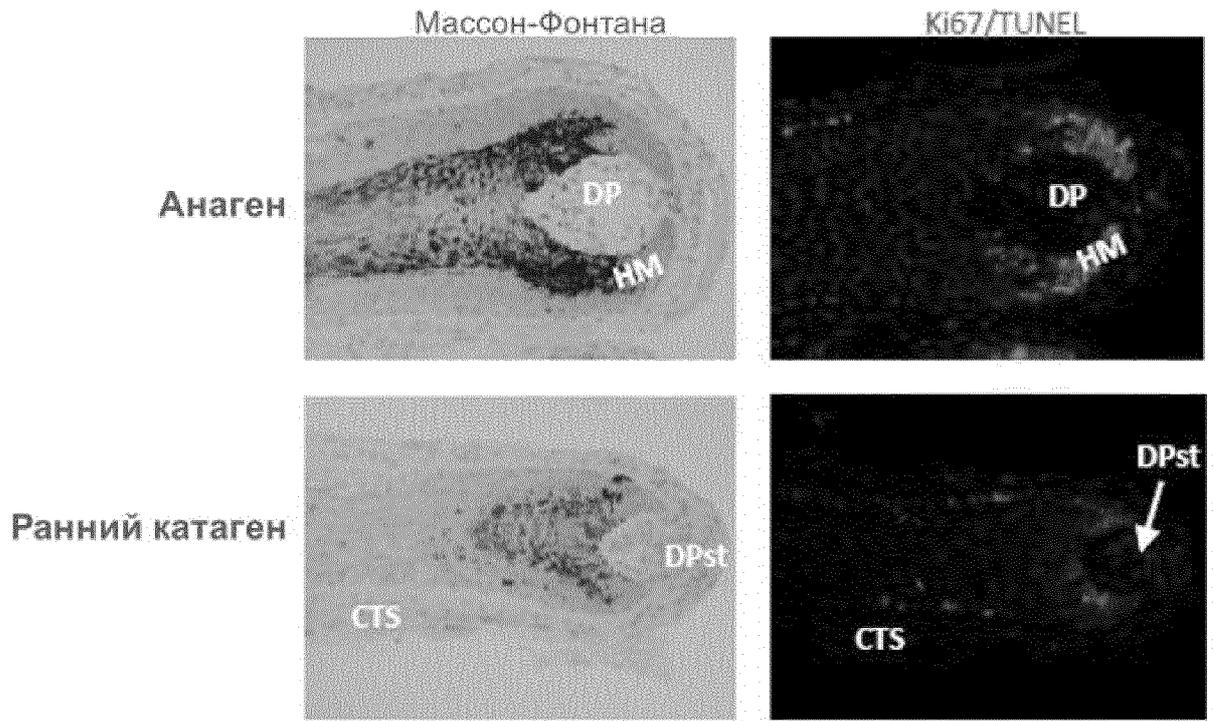
Фиг. 11



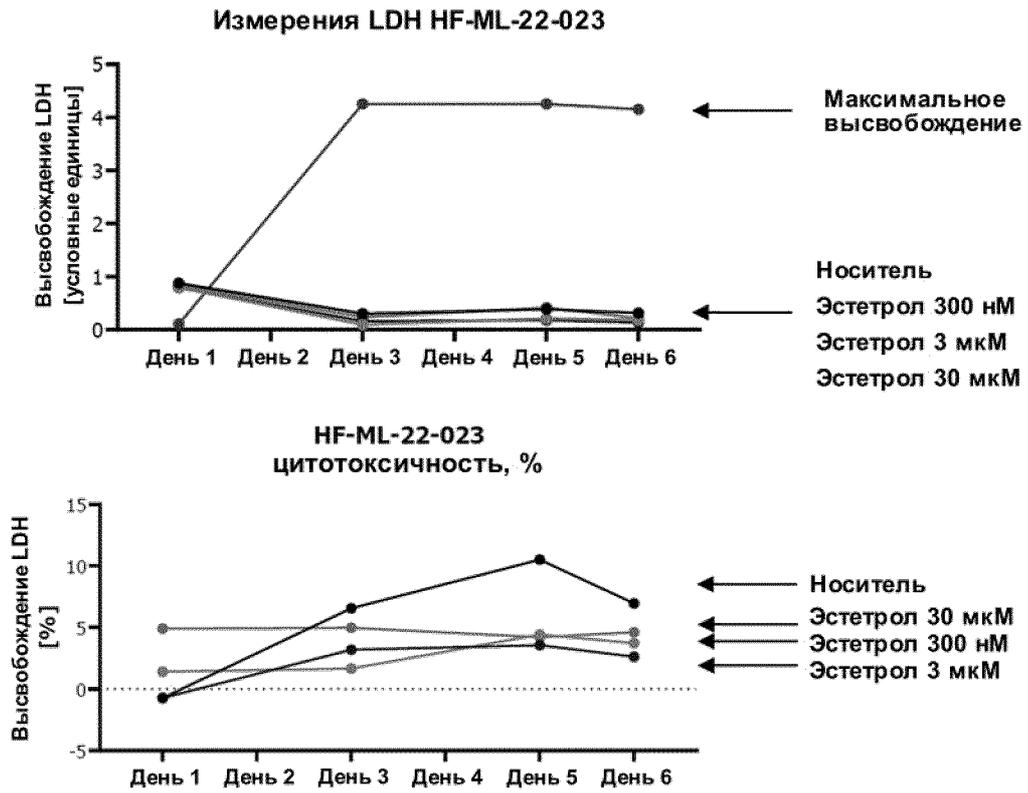
Фиг. 12



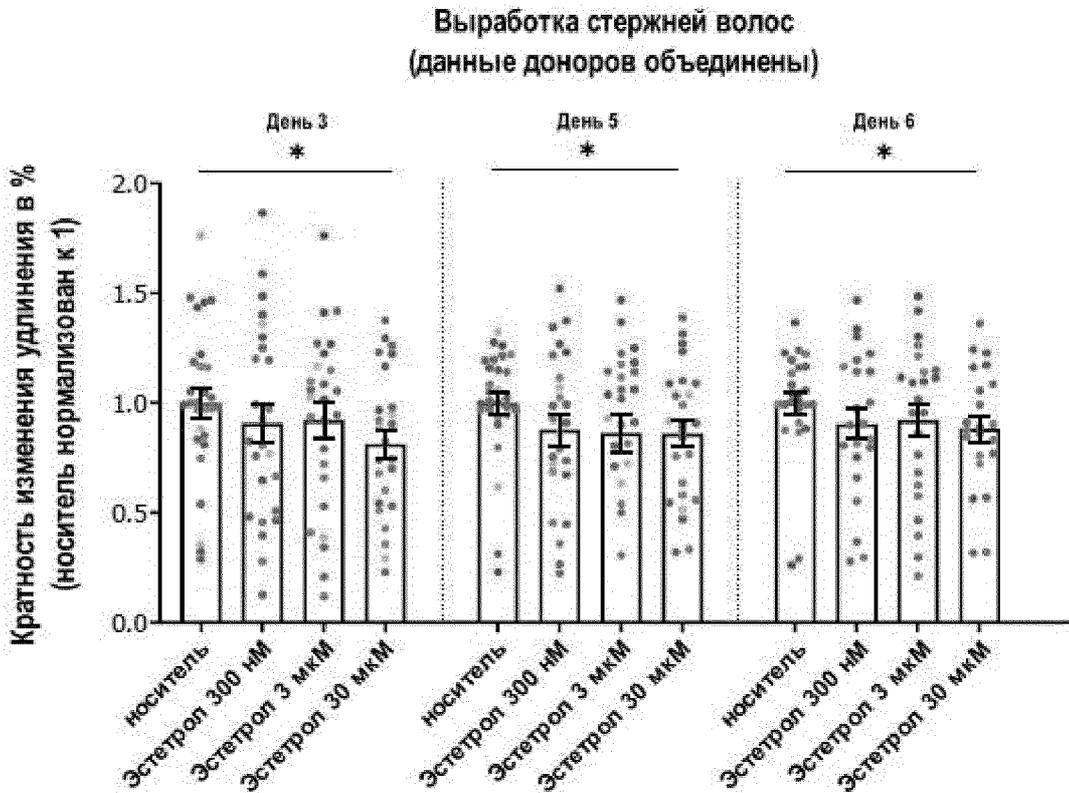
Фиг. 13



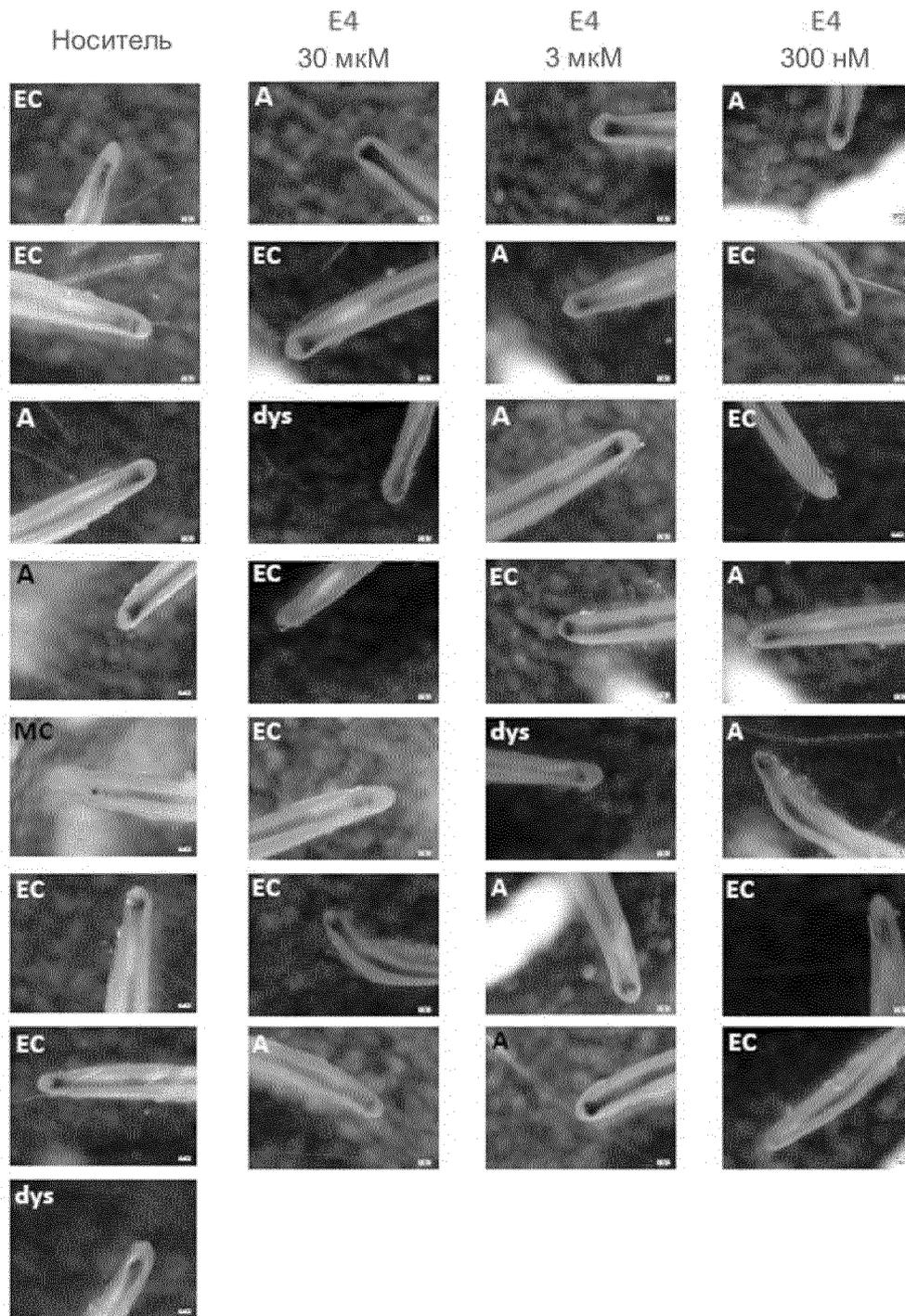
Фиг. 14



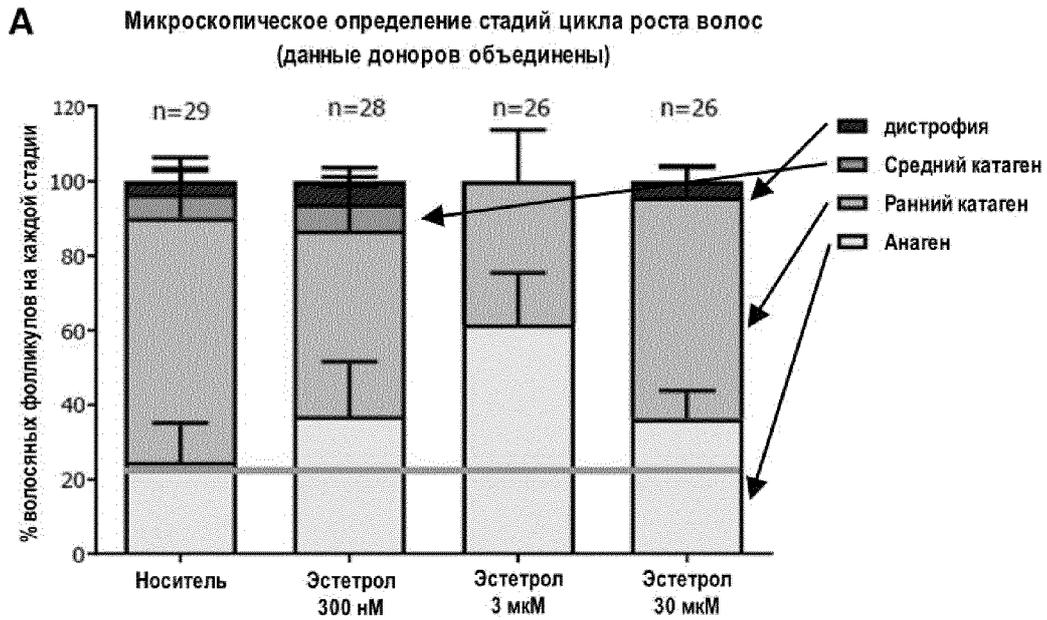
Фиг. 15



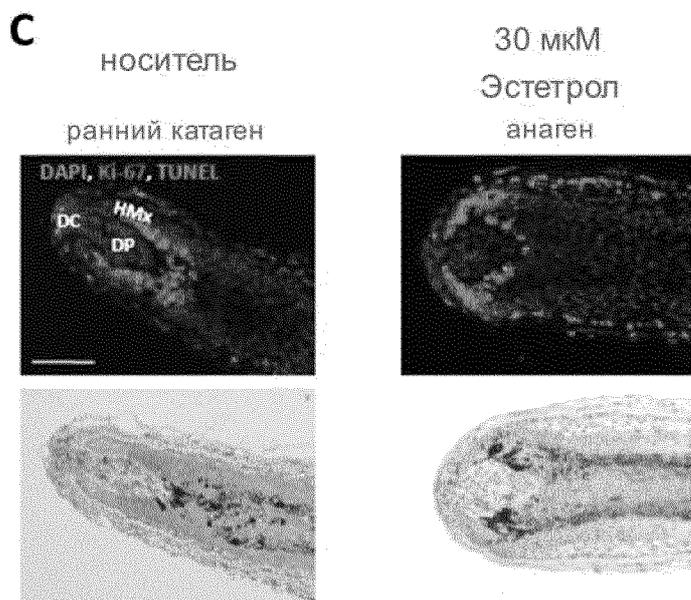
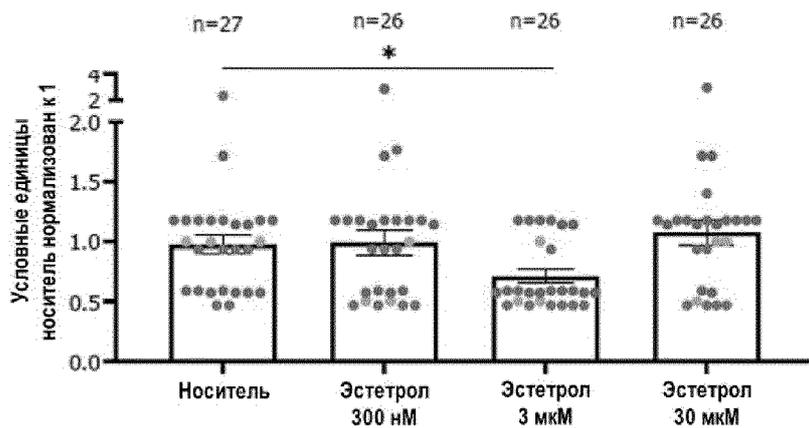
Фиг. 16



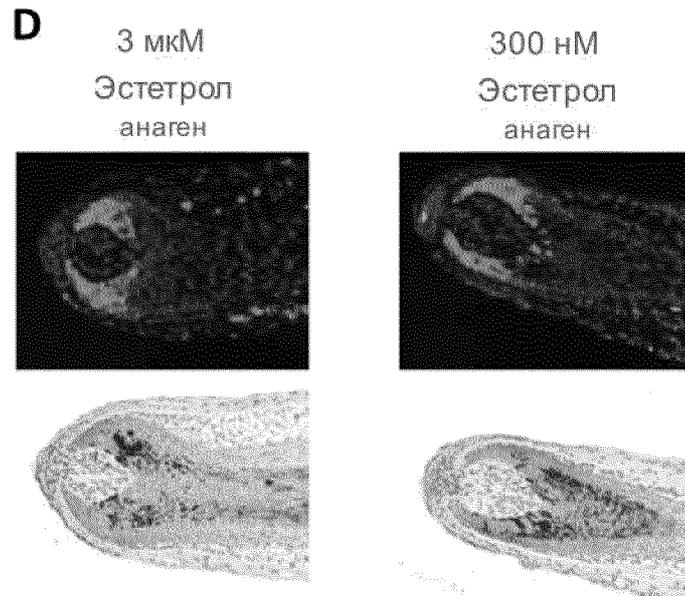
Фиг. 16 (продолжение)



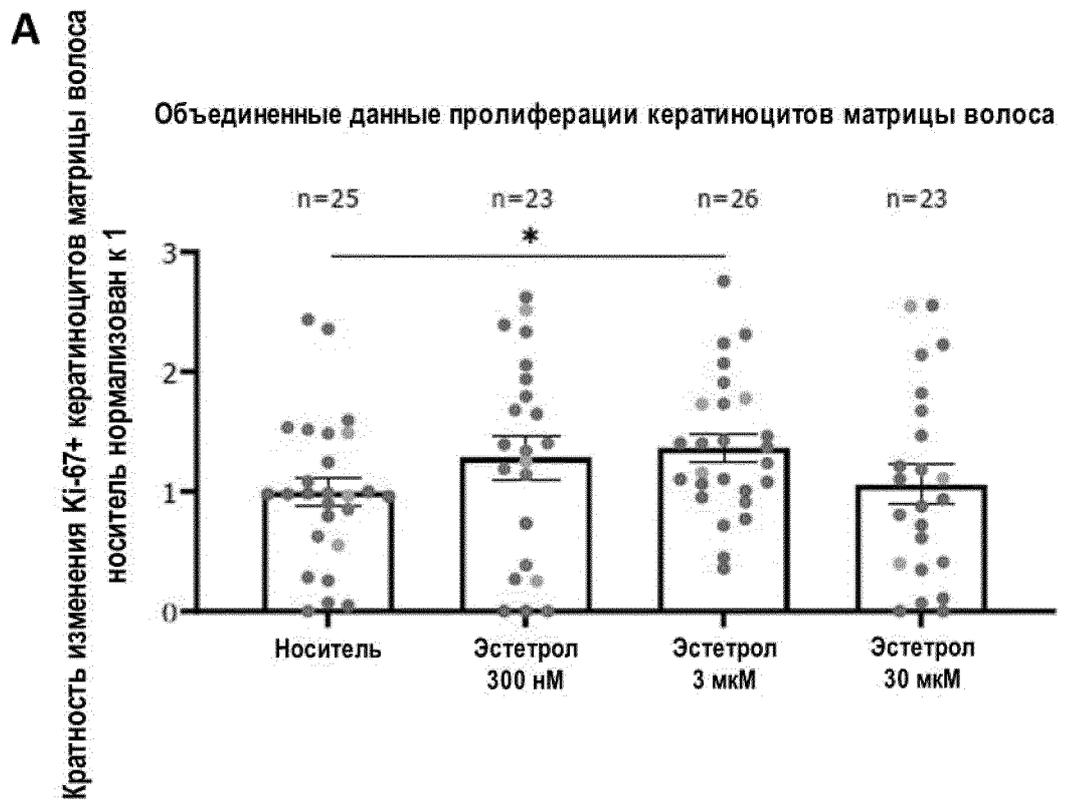
**B** Объединенная микроскопическая оценка цикла роста волос



Фиг. 17



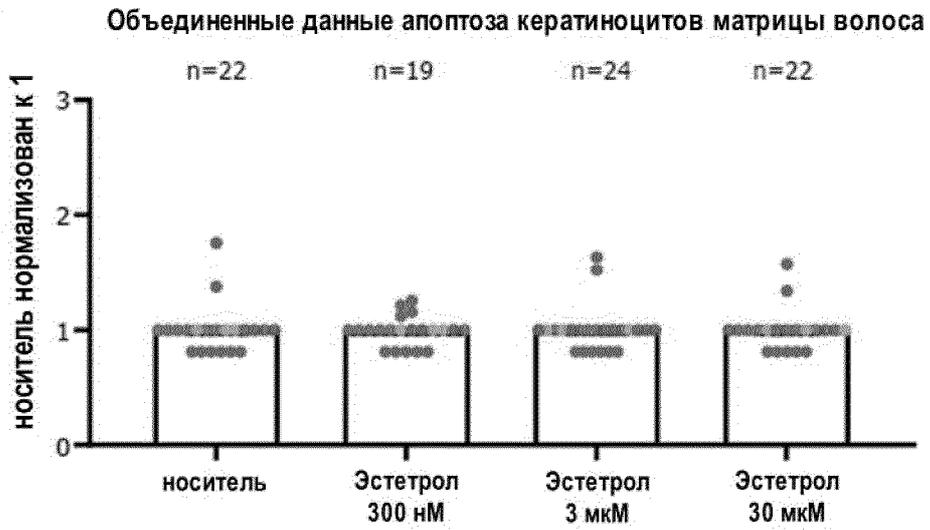
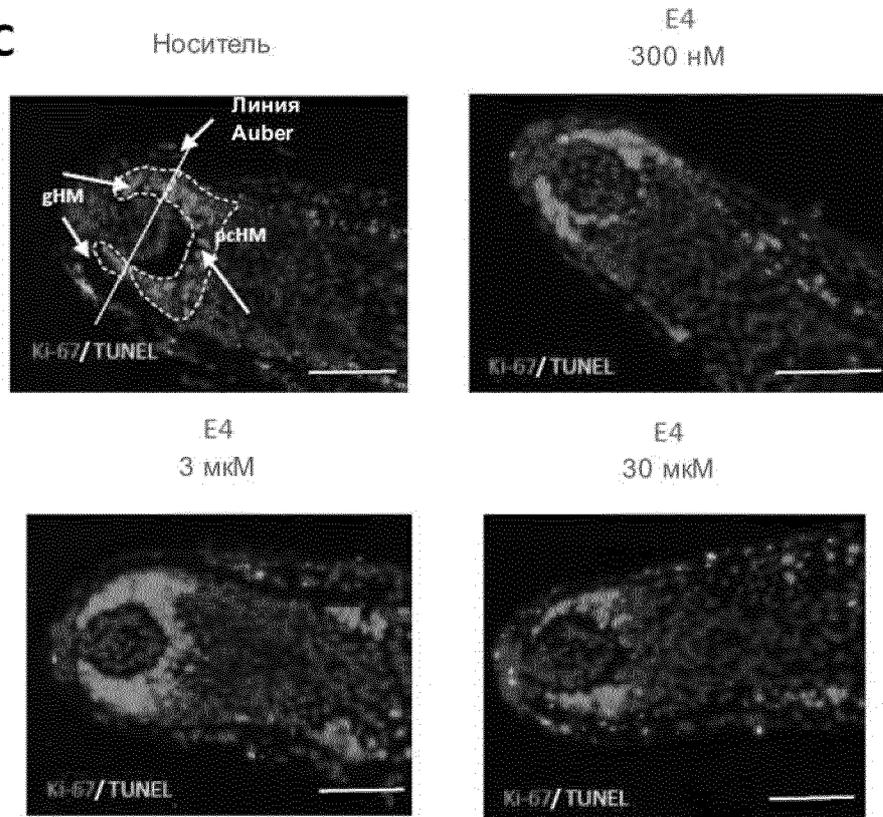
Фиг. 17 (продолжение)



Фиг. 18

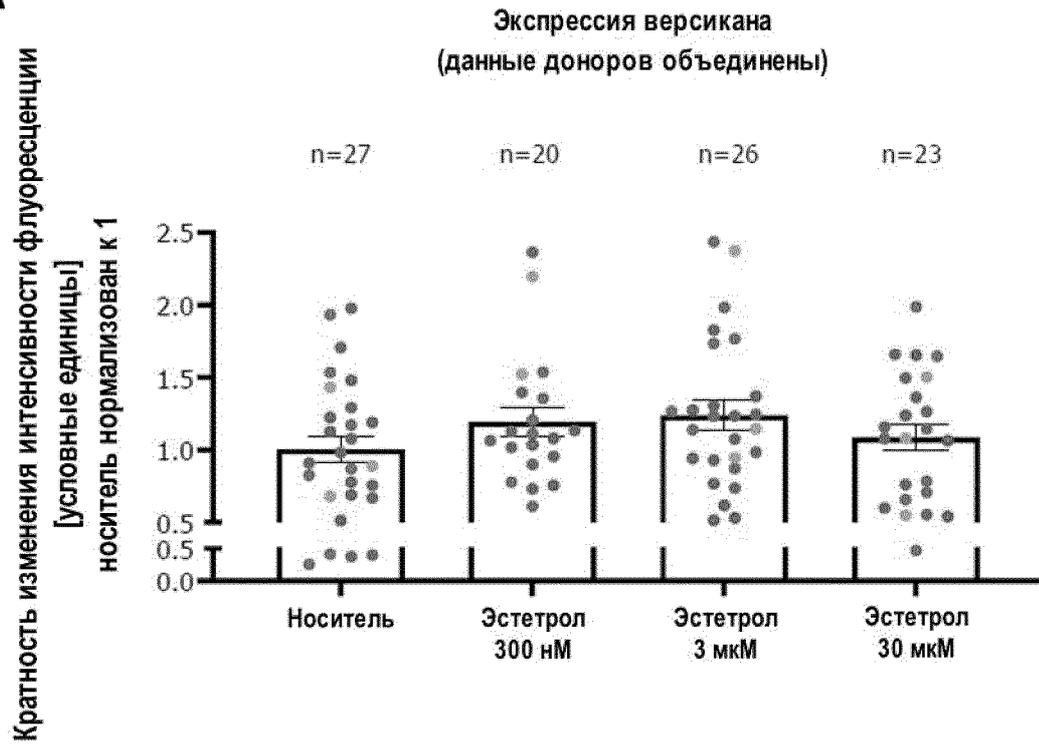
**B**

Кратность изменения TUNEL+ кератиноцитов матрицы волоса

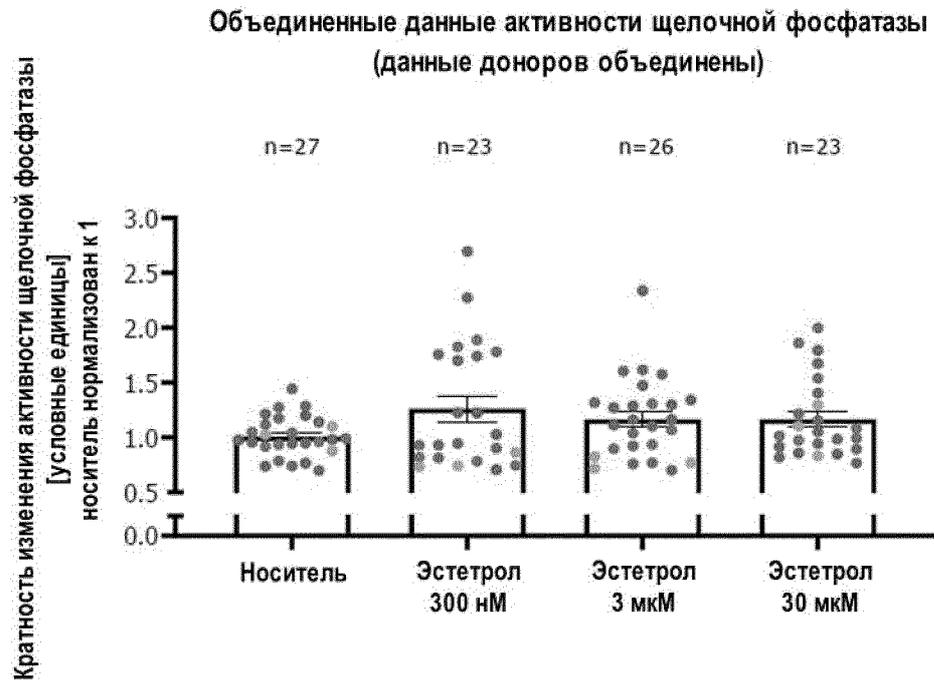
**C**

Фиг. 18 (продолжение)

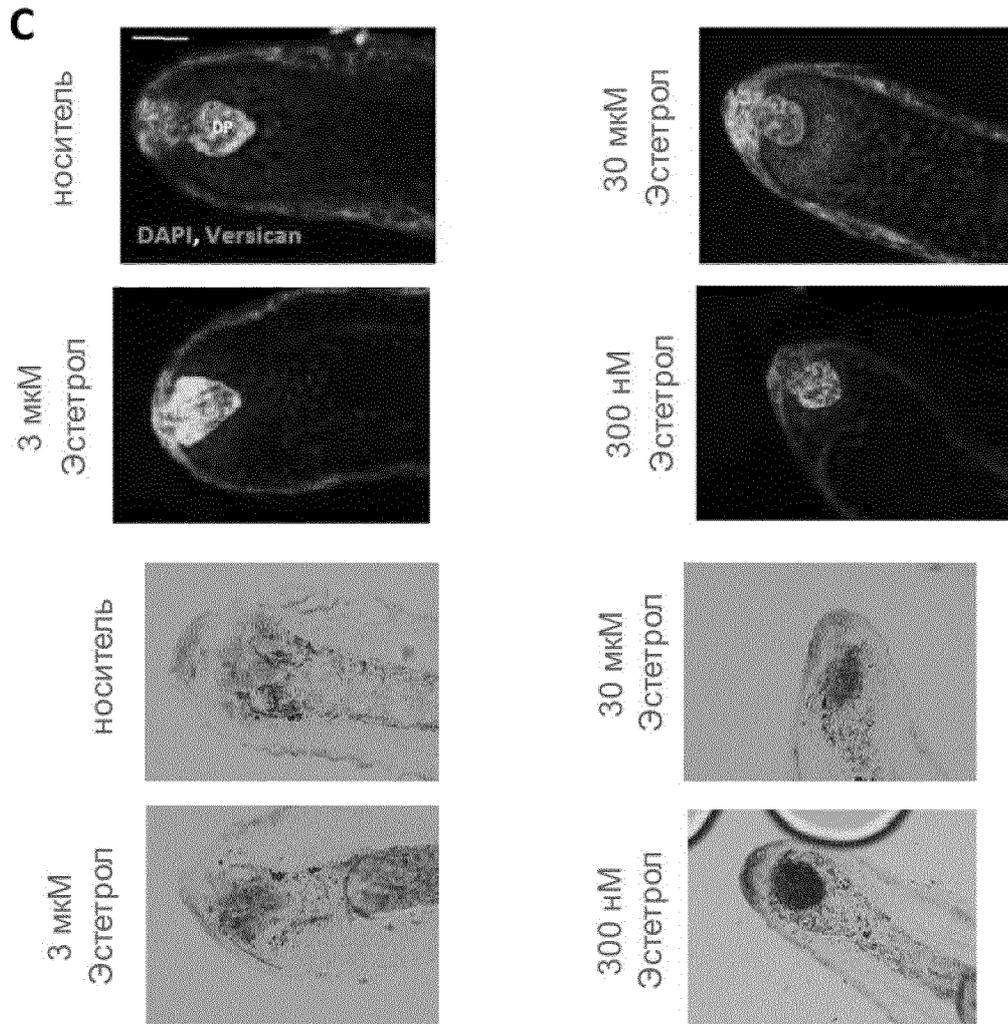
А



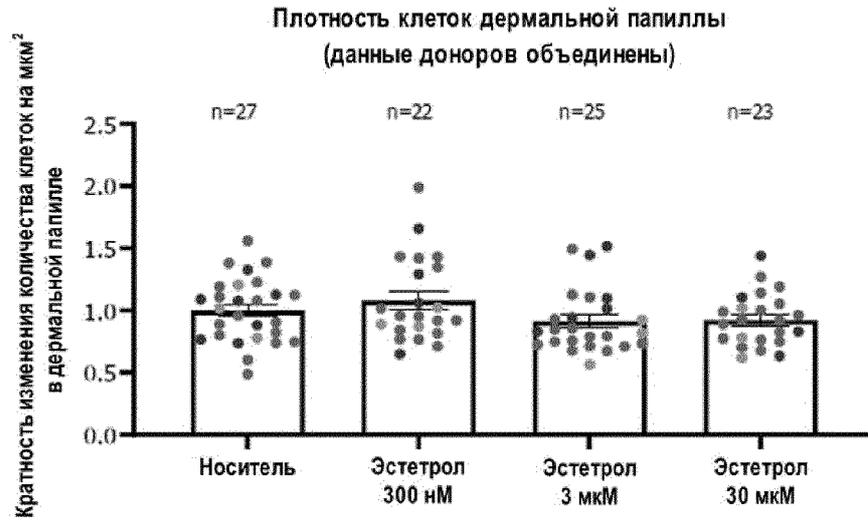
В



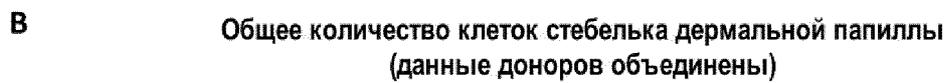
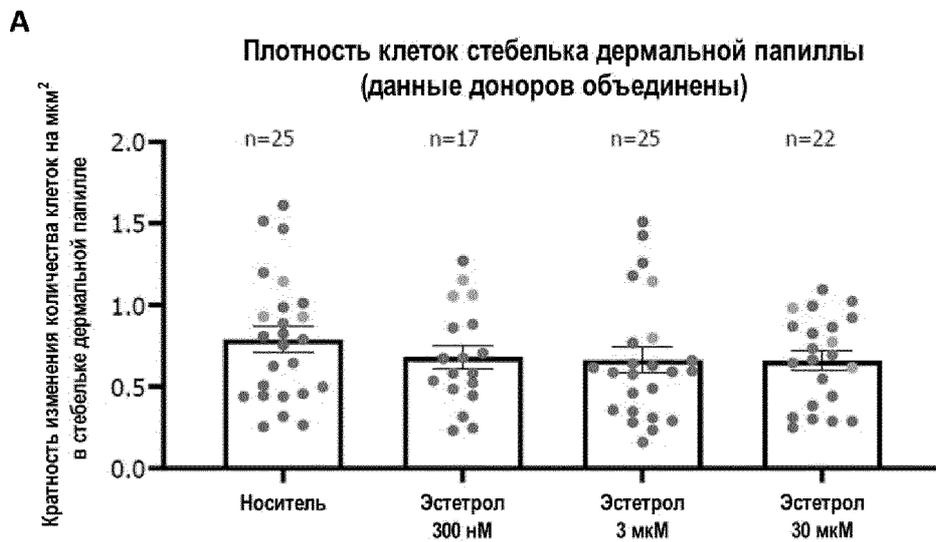
Фиг. 19



Фиг. 19 (продолжение)

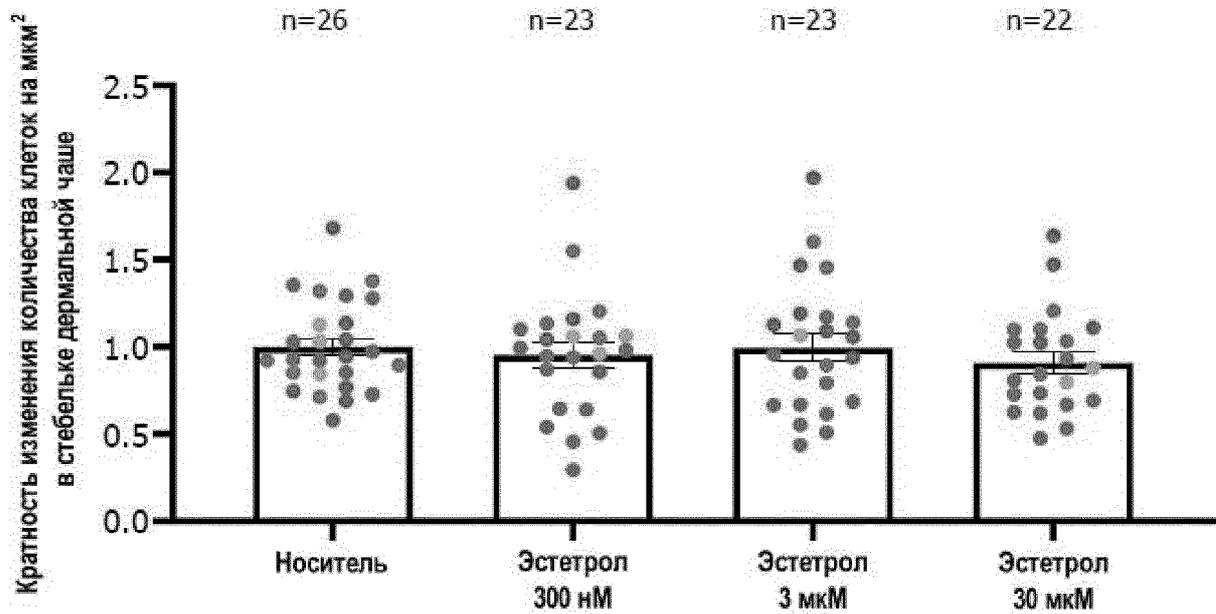


Фиг. 20



Фиг. 21

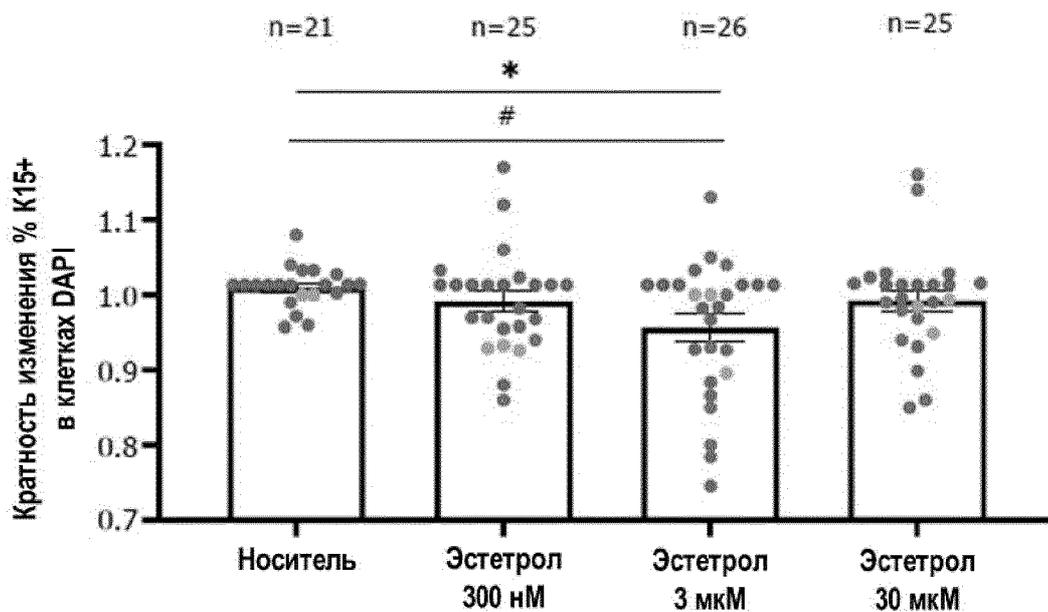
## Объединенные данные плотности клеток дермальной чаши



Фиг. 22

А

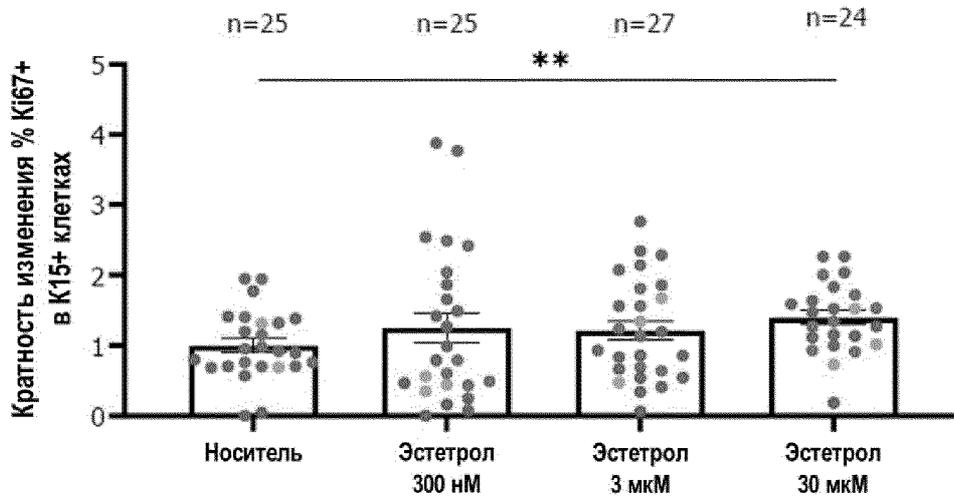
## Процент K15+ клеток в базальном слое выступа (данные доноров объединены)



Фиг. 23

В

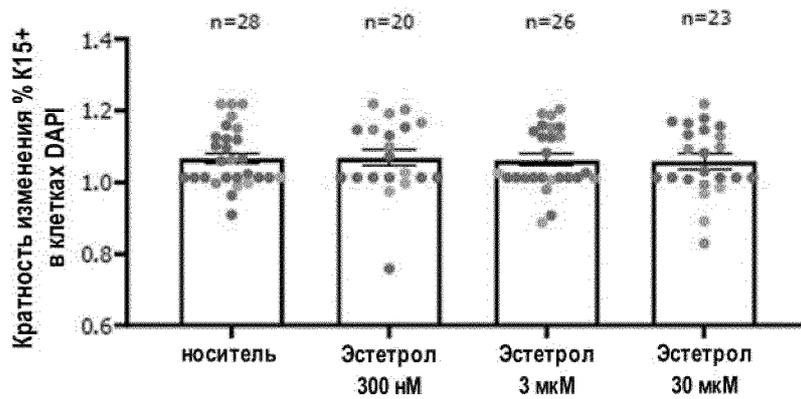
Процент Ki-67+ клеток в базальном слое выступа  
(данные доноров объединены)



Фиг. 23 (продолжение)

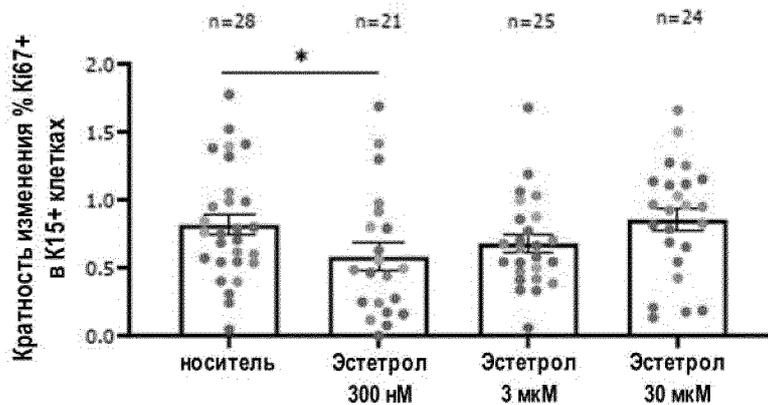
А

Процент K15+ клеток в супрабульбарном базальном слое  
(данные доноров объединены)



В

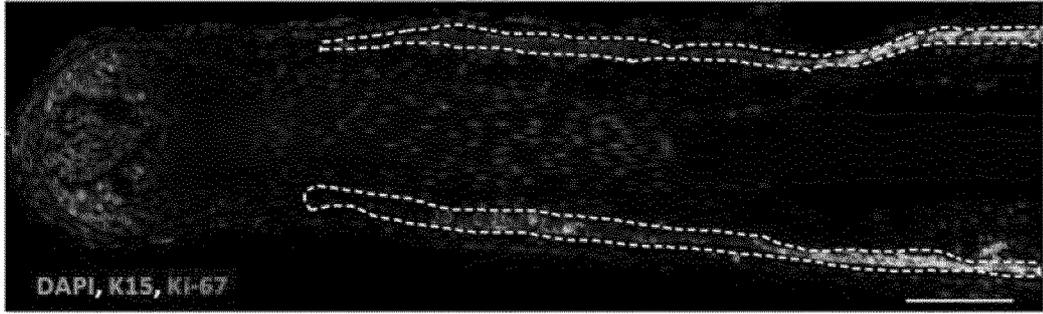
Процент Ki-67+ клеток в супрабульбарном базальном слое  
(данные доноров объединены)



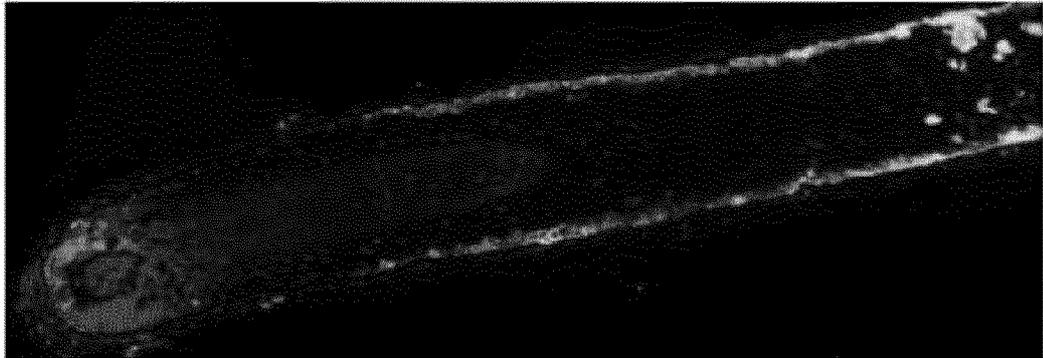
Фиг. 24

**С**

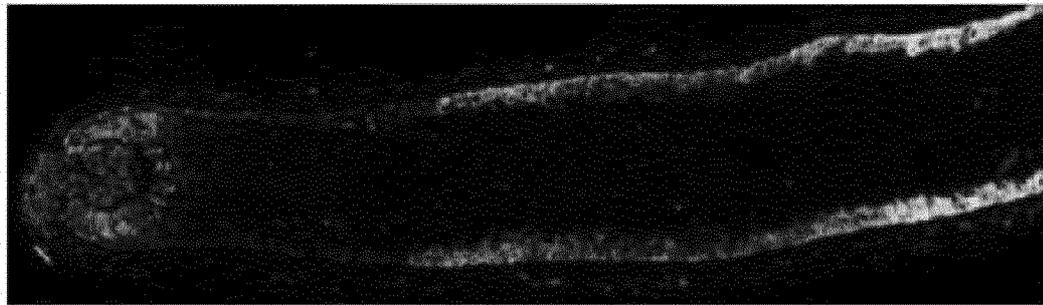
НОСИТЕЛЬ



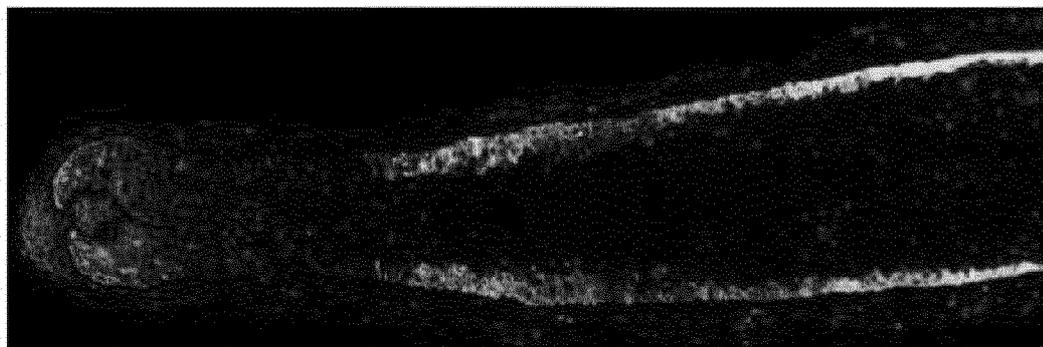
Эстетрол, 30 мкМ



Эстетрол, 3 мкМ



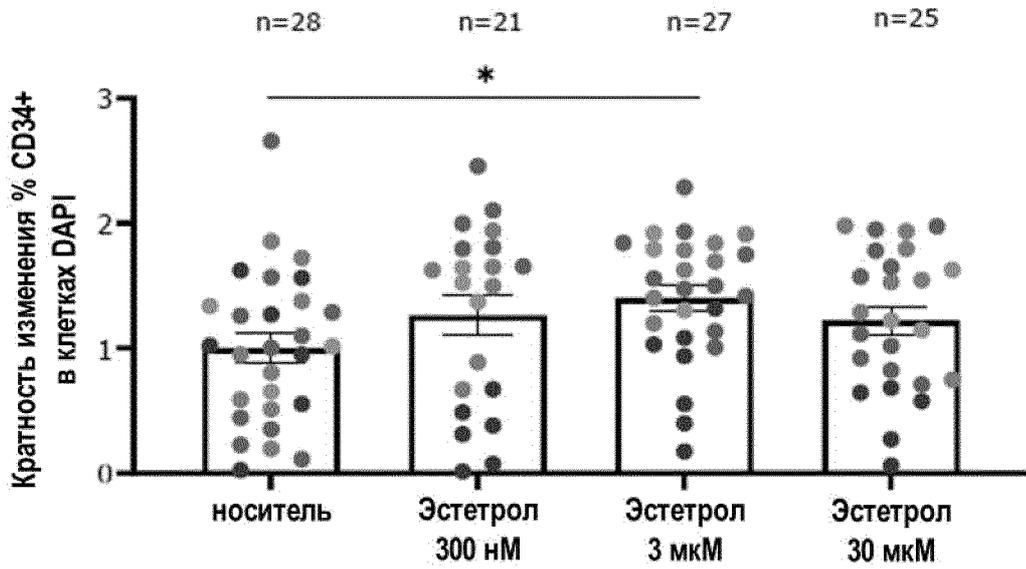
Эстетрол, 300 нМ



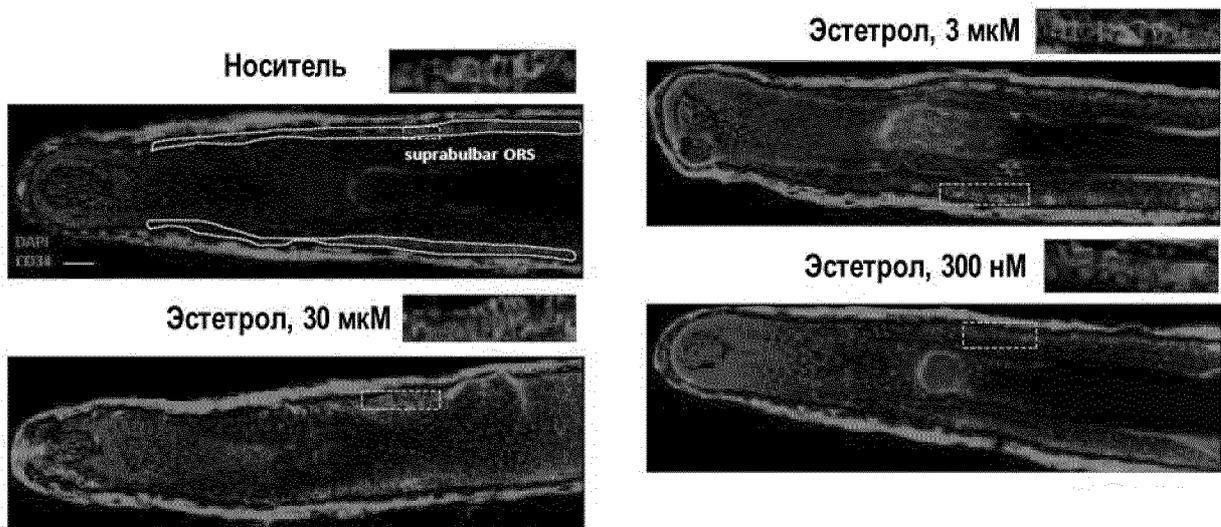
Фиг. 24 (продолжение)

A

Процент CD34+ клеток  
в базальном слое выступа  
(данные доноров объединены)



B



Фиг. 25