

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041509**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- | | |
|---|---|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.31</p> <p>(21) Номер заявки
201200369</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2008.08.08</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>A61K 31/5685</i> (2006.01)
<i>A61K 31/453</i> (2006.01)
<i>A61K 31/56</i> (2006.01)
<i>A61P 15/12</i> (2006.01)
<i>A61P 5/26</i> (2006.01)
<i>A61P 5/32</i> (2006.01)</p> |
|---|---|

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В КОМБИНАЦИИ С СЕЛЕКТИВНЫМ МОДУЛЯТОРОМ ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ И СОСТОЯНИЙ У ПОСТМЕНОПАУЗНЫХ ЖЕНЩИН

- | | |
|---|--|
| <p>(31) 60/964,270; 60/964,673</p> <p>(32) 2007.08.10; 2007.08.13</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2012.09.28</p> <p>(62) 201000312; 2008.08.08</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭНДОРЕШЕРШ, ИНК. (СА)</p> <p>(72) Изобретатель:
Лабри Фернанд (СА)</p> <p>(74) Представитель:
Агуреев А.П., Фелицына С.Б. (RU)</p> | <p>(56) CA-1320132
CA-2154161
CA-2334577
CA-2515426
CA-2584524</p> |
|---|--|

(57) Описаны применение и фармацевтические композиции для лечения и/или уменьшения вероятности приобретенных симптомов или заболеваний вследствие менопаузы у постменопаузальных женщин, в частности остеопороза, вагинальной атрофии и сухости, гипогонадизма, низкого либидо, кожной атрофии, коллагеноза, недержания мочи, рака молочной железы, рака эндометрия, рака яичников и рака матки, приливов, потери мышечной массы, инсулинорезистентности, усталости, потери энергии, старения, физических симптомов менопаузы, у чувствительных теплокровных животных, в том числе людей, включающие в себя введение предшественника половых стероидных гормонов. Изобретение предусматривает новые способы введения и дозирования дегидроэпиандростерона (DHEA) для использования положительных андрогенных эффектов в вагинальных слоях lamina propria (собственной пластинке слизистой оболочки) и/или слое muscularis (мышечной пластинке слизистой оболочки), без вызывания нежелательных системных эстрогенных эффектов во избежание риска рака молочной железы и рака матки.

B1

041509

041509

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение обеспечивает новые способы введения и дозирования дегидроэпиандростерона (DHEA) для использования положительных андрогенных действий (например, в вагинальных слоях *Iamina propria* (собственной пластинке слизистой оболочки) и/или слое *muscularis* (мышечной пластинке слизистой оболочки), без вызывания нежелательных системных эстрогенных эффектов. Кроме DHEA, могут быть использованы другие предшественники половых стероидных гормонов (например, сульфат дегидроэпиандростерона, андрост-5-ен-3 β ,17 β -диол и 4-андростен-3,17-дион).

Уровень техники

Известны многие связанные с гормонами терапии. Например, многие обеспечивают половой стероидный гормон эстроген или андроген системно и/или в ткань-мишень. Кроме прямого введения андрогенов и/или эстрогенов, предшественники половых стероидных гормонов, которые могут превращаться в эстроген и/или андроген в конкретной ткани, также были использованы для многих состояний. Как андрогены, так и эстрогены могут быть полезными в некоторых контекстах и вредными в других. Это зависит *inter alia* от ткани-мишени, конкретных потребностей, представленных пациентом, и степенью, в которой может поражаться ткань, не являющаяся мишенью. Некоторые терапии, хотя они и являются нацеленными, все еще могут иметь нежелательную активность в другом участке в теле (например, локальное введение этого фармацевтического агента приводит, тем не менее, к увеличенному системному присутствию либо фармацевтического вещества, либо одного из его метаболитов. Механизм действия также не всегда является полностью понятным, особенно относительные вклады в него андрогенов и эстрогенов.

Сущность изобретения

Таким образом, целью данного изобретения является использование конкретных доз композиций и способов введения для лучшего достижения полезных эффектов половых стероидных гормонов и лучшей элиминации их нежелательных побочных эффектов.

В одном аспекте, это изобретение обеспечивает способ лечения и/или уменьшения вероятности приобретения вагинальных заболеваний или состояний, связанных с гормональным дисбалансом в постменопаузальных (постклимактерических) женщинах, причем указанный способ включает в себя введение предшественника полового стероидного гормона, выбранного из группы, состоящей из дегидроэпиандростерона, сульфата дегидроэпиандростерона, андростен-5-ен-3 β ,17 β -диола и 4-андростен-3,17-диола, пациенту, нуждающемуся в указанном лечении, где этот указанный предшественник полового стероидного гормона вводят в терапевтическом количестве, которое увеличивает уровень циркулирующих метаболитов андрогена без увеличения уровня эстрадиола выше величин, обнаруживаемых в здоровых постменопаузальных женщинах.

В другом аспекте, это изобретение обеспечивает способ лечения и/или уменьшения вероятности приобретения симптомов или заболеваний, обусловленных менопаузой (климаксом), в постменопаузальных женщинах, причем указанный способ включает в себя введение предшественника полового стероидного гормона, выбранного из группы, состоящей из дегидроэпиандростерона, сульфата дегидроэпиандростерона, андростен-5-ен-3 β ,17 β -диола и 4-андростен-3,17-диола, пациенту, нуждающемуся в указанном лечении, где этот указанный предшественник полового стероидного гормона вводят в терапевтическом количестве, которое увеличивает уровень циркулирующих метаболитов андрогена без увеличения уровня эстрадиола выше величин, обнаруживаемых в здоровых постменопаузальных женщинах, во избежание риска рака молочной железы и рака матки.

В другом аспекте, это изобретение обеспечивает способ лечения и/или уменьшения вероятности приобретения симптомов или заболеваний, обусловленных менопаузой (климаксом), в постменопаузальных женщинах, причем указанный способ включает в себя введение предшественника полового стероидного гормона, выбранного из группы, состоящей из дегидроэпиандростерона, сульфата дегидроэпиандростерона, андростен-5-ен-3 β ,17 β -диола и 4-андростен-3,17-диола, пациенту, нуждающемуся в указанном лечении, где этот указанный предшественник полового стероидного гормона вводят в терапевтическом количестве, которое увеличивает уровень циркулирующих метаболитов андрогена, и дополнительно включает в себя введение в виде части комбинаторной терапии терапевтически эффективного количества Селективного Модулятора рецептора Эстрогена во избежание риска рака молочной железы и рака матки, обычно присутствующего в постменопаузальной женщине, и для предотвращения разрежения кости (остеопороза), накопления жира и диабета типа 2.

В другом аспекте, это изобретение обеспечивает способ лечения вагинальных состояний слоя *Iamina propria* или слоя *muscularis*, предусматривающий вагинальное введение в суточной дозе 3-13 мг.

В другом аспекте, это изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую предшественник полового стероидного гормона, выбранный из группы, состоящей из дегидроэпиандростерона, сульфата дегидроэпиандростерона, андростен-5-ен-3 β ,17 β -диола и 4-андростен-3,17-диола, и дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель, выбранные из группы, состоящей из триглицеридов насыщенных кислот C₁₂-C₁₈ с варьирующимися частями соответствующих неполных глицеридов (твердого жира, Witepsol), масла, смешанных триглицеридов олеиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот (какао-масла), частично гидрогенизированного хлопко-

вого масла (Cotomar), гидрогенизированных жирных спиртов и эфиров (Dehydag Base I, Base II или Base III, могут также содержать глицириды насыщенных жирных кислот (C_{12} - C_{16}), триглицеридов из пальмы, пальмоядрового масла и кокосовых масел с самоэмульгирующимся глицирилмоностеаратом и полиоксилстеаратом (Fattibase), Hexaride Base 95, высокоплавких фракций кокосового и пальмоядрового масла (Hydrokote), перегруппированных гидрогенизированных растительных масел (S-70-XX95 и S-070-XXA), эвтектических смесей моно-, ди-, триглицеридов, полученных из природных растительных масел (Suppocire), Tegester-триглицеридов, Твина 61, триглицеридов, полученных из кокосового масла (Wecobee), масла-какао, полусинтетических глициридов (Jaroscire, Ovucire), смесей три-, ди- и моноглицеридов насыщенных жирных кислот (Massa Estarinum) и комбинации вышеуказанных компонентов (см. Allen et al., 2008). Любой носитель, в том числе жидкость, в которой DHEA и другие предшественники являются растворимыми, включен в это изобретение.

В другом аспекте, это изобретение обеспечивает вагинальный суппозиторий, содержащий 0,25-2,00 мас.%, более конкретно, 0,5 мас.% DHEA, относительно общей массы суппозитория, и дополнительно содержащий липофильный эксципиент. Особенно подходящим эксципиентом является witepsol H-15.

Посредством обеспечения желаемых андрогенных эффектов без эстрогенных системных эффектов, можно избежать системных побочных действий эстрогена, таких как увеличенный риск рака молочной железы и эндометрия, обнаруживаемые при использовании существующих основанных на эстрогене локальных и системных эстроген-заместительных терапий (Labrie, Cusan et al., Menopause, in press).

Наряду с другими формами введения предшественников, это изобретение обеспечивает вагинальные суппозитории и вагинальные кремы, приготовленные с предпочтительными эксципиентами и предпочтительными концентрациями предшественника.

Вагинальное введение является предпочтительным, так как локальное действие может обеспечивать желаемые андрогенные действия на желаемые вагинальные слои при гораздо более низких дозах, чем при введении другими способами. Введение доз другими способами введения может быть также использовано с изменением прежних доз и концентраций для известной вариации между этими способами введения. Лечащий врач должен изменять дозы подходящим образом в соответствии с реакцией индивидуального пациента.

В предпочтительных вариантах осуществления, предшественником полового стероидного гормона является DHEA.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 показывает уровни в сыворотке DHEA и 5-диола в день 1 или день 7 в 40-75-летних постменопаузальных женщинах после ежедневного введения вагинальных суппозитория, содержащих 0, 0,5, 1,0 или 1,8% DHEA. Данные выражены в виде средних величин \pm SEM (n=9 или 10).

Фиг. 2 показывает уровни в сыворотке Тесто и DHT в день 1 или день 7 в 40-75-летних постменопаузальных женщинах после ежедневного введения вагинальных суппозитория, содержащих 0, 0,5, 1,0 или 1,8% DHEA (n=8). Данные выражены в виде средних величин \pm SEM (n=8-9). Уровни Тесто (тестостерона) из одного пациента в группе плацебо исключали вследствие необъяснимых высоких уровней Тесто, не отраженных в случае любого другого стероида.

Фиг. 3 показывает уровни в сыворотке E_1 и E_2 в день 1 или день 7 в 40-75-летних постменопаузальных женщинах после ежедневного введения вагинальных суппозитория, содержащих 0, 0,5, 1,0 или 1,8% DHEA. Данные выражены в виде средних величин \pm SEM (n=9 или 10).

Фиг. 4 показывает уровни в сыворотке E_1 -S и DHEA-S в день 1 или день 7 в 40-75-летних постменопаузальных женщинах после ежедневного введения вагинальных суппозитория, содержащих 0, 0,5, 1,0 или 1,8% DHEA. Данные выражены в виде средних величин \pm SEM (n=9 или 10).

Фиг. 5 показывает уровни в сыворотке 4-диола и ADT-G в день 1 или день 7 в 40-75-летних постменопаузальных женщинах после ежедневного введения вагинальных суппозитория, содержащих 0, 0,5, 1,0 или 1,8% DHEA. Данные выражены в виде средних величин \pm SEM (n=9 или 10).

Фиг. 6 показывает уровни в сыворотке 3 α -диол-3G и 3 α -диол-17G в день 1 или день 7 в 40-75-летних постменопаузальных женщинах после ежедневного введения вагинальных суппозитория, содержащих 0, 0,5, 1,0 или 1,8% DHEA (n=8). Данные выражены в виде средних величин \pm SEM (n=8-10).

Фиг. 7 показывает среднюю 24-часовую концентрацию в сыворотке ($AUC_{0-24h}/24$) DHEA, 5-диола, DHEA-S, 4-диола, Тесто и DHT, измеренную в день 1 или день 7 в 40-75-летних постменопаузальных женщинах после ежедневного введения вагинальных суппозитория, содержащих 0, 0,5, 1,0 или 1,8% DHEA. Данные выражали в виде средних величин \pm SEM (n=8-10). Уровни Тесто из одного пациента в группе плацебо исключали (n=8 в этой группе). Концентрации стероидных гормонов в сыворотке, измеренные в 30-35-летних постменопаузальных женщин, добавляли в качестве ссылки. Данные выражали в виде среднего (n=47) с указанием 5-го и 95-го перцентилей (пунктирные линии). *, p<0,05, **, p<0,01, экспериментальных данных (день 7) против плацебо (день 7).

Фиг. 8 показывает среднюю 24-часовую концентрацию в сыворотке ($AUC_{0-24h}/24$) ADT-G, 3 α -диол-3G, 3 α -диол-17G, E_1 , E_2 и E_1 -S, измеренную в день 1 или день 7 в 40-75-летних постменопаузальных

женщинах после ежедневного введения вагинальных суппозиториях, содержащих 0, 0,5, 1,0 или 1,8% DHEA. Данные выражали в виде средних величин \pm SEM (n=9 или 10). Концентрации стероидных гормонов в сыворотке, измеренные в 30-35-летних постменопаузальных женщин, добавляли в качестве ссылки. Данные выражали в виде среднего (n=47) с указанием 5-го и 95-го перцентилей (пунктирные линии). *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, экспериментальных данных (день 7) против плацебо (день 7).

Фиг. 9 показывает изменения уровней в сыворотке суммы андрогенных метаболитов ADT-G, 3 α -диол-17G в постменопаузальных женщинах с вагинальной атрофией после интравагинального введения увеличивающихся доз DHEA. Эти данные выражены в виде процента уровней в сыворотке одних и тех же стероидных метаболитов, наблюдаемых в молодых взрослых (30-35-летних) имеющих менструальный цикл предменопаузальных (предменопаузальных) женщин. Уровень превращения получают делением суммы уровней в сыворотке ADT-G, 3 α -диол-3G и 3 α -диол-17G в женщинах, которые получали дозы 0,5, 1,0 и 1,8% DHEA, на величины, обнаруживаемые в предменопаузальных (предменопаузальных) женщинах (данные из Labrie et al., 2006). Изменения DHEA в сыворотке в сравнении со здоровыми предменопаузальными женщинами показаны также в качестве сравнения для показа эффективности превращения (0---0), и () фоновых уровней андрогенных метаболитов и DHEA, соответственно.

Фиг. 10 показывает индекс зрелости (A) вагинальный pH (B), измеренные в день 1 и день 2 в 40-75-летних постменопаузальных женщинах после ежедневного введения вагинальных суппозиториях, содержащих 0, 0,5, 1,0 или 1,8% DHEA. Данные выражали в виде средних величин \pm SEM (n=9 или 10). *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, данных в день 7 против данных в день 1.

Фиг. 11 показывает временной ход в сыворотке дегидроэпиандростерона (DHEA) (A) и андрост-5-ен-3 β ,17 β -диола (5-диола) (B) после единственного перорального введения двух капсул по 50 мг DHEA или применения 4 г 10%-ного крема или геля DHEA для постменопаузальных женщин.

Фиг. 12 показывает временной ход в сыворотке андростендиона (4-диола) (A) и тестостерона (B) после единственного перорального введения двух капсул по 50 мг DHEA или применения 4 г 10%-ного крема или геля DHEA для постменопаузальных женщин.

Фиг. 13 показывает временной ход в сыворотке эстрона (E₁) (A) и 17 β -эстрадиола (E₂) (B) после единственного перорального введения двух капсул по 50 мг DHEA или применения 4 г 10%-ного крема или геля DHEA для постменопаузальных женщин.

Фиг. 14 показывает временной ход в сыворотке сульфата дегидроэпиандростерона (DHEA-S) (A) и сульфата эстрона (E₁-S) (B) после единственного перорального введения двух капсул по 50 мг DHEA или применения 4 г 10%-ного крема или геля DHEA для постменопаузальных женщин.

Фиг. 15 показывает временной ход в сыворотке андростеронглюкуронида (ADT-G) (A) и андростон-3 α ,17 β -диолглюкуронида (3 α -диол-G) (B) после ежедневного перорального введения двух капсул по 50 мг DHEA или применения 4 г 10%-ного крема или геля DHEA для постменопаузальных женщин.

Фиг. 16 показывает временной ход в сыворотке дегидроэпиандростерона (DHEA) (A) и андрост-5-ен-3 β ,17 β -диола (5-диола) (B) после ежедневного перорального введения двух капсул по 50 мг DHEA или применения 4 г 10%-ного крема или геля DHEA для постменопаузальных женщин. Измерения выполняли в день 14 введения доз.

Фиг. 17 показывает временной ход в сыворотке андростендиона (4-диола) (A) и тестостерона (B) после ежедневного перорального введения двух капсул по 50 мг DHEA или применения 4 г 10%-ного крема или геля DHEA для постменопаузальных женщин. Измерения выполняли в день 14 введения доз.

Фиг. 18 показывает временной ход в сыворотке эстрона (E₁) (A) и эстрадиола (E₂) (B) после ежедневного перорального введения двух капсул по 50 мг DHEA или применения 4 г 10%-ного крема или геля DHEA для постменопаузальных женщин. Измерения выполняли в день 14 введения доз.

Фиг. 19 показывает временной ход в сыворотке сульфата дегидроэпиандростерона (DHEA-S) (A) и сульфата эстрона (E₁-S) (B) после ежедневного перорального введения двух капсул по 50 мг DHEA или применения 4 г 10%-ного крема или геля DHEA для постменопаузальных женщин. Измерения выполняли в день 14 введения доз.

Фиг. 20 показывает временной ход в сыворотке андростеронглюкуронида (ADT-G) (A) и андрост-5-ен-3 β ,17 β -диол-G (3 α -диол-G) (B) после ежедневного перорального введения двух капсул по 50 мг DHEA или применения 4 г 10%-ного крема или геля DHEA для постменопаузальных женщин. Измерения выполняли в день 14 введения доз.

Фиг. 21 показывает отношения величин AUC_{0-24ч} DHEA и его метаболитов в день 14 введения доз в сравнении с фоновыми величинами перед обработкой. Соответствующие численные величины можно найти в табл. 5.

Фиг. 22 показывает действие ежедневного интравагинального применения 0,0, 0,25, 0,5 и 1,0% DHEA (Prasterone) в течение 2, 4, 8 и 12 недель на процент вагинальных парабазальных клеток в постменопаузальных женщинах. Данные выражены в виде средних величин \pm SEM.

Фиг. 23 показывает действие ежедневного интравагинального применения 0,0, 0,25, 0,5 и 1,0% DHEA (Prasterone) в течение 2, 4, 8 и 12 недель на процент вагинальных поверхностных клеток в постменопаузальных женщинах. Данные выражены в виде средних величин \pm SEM.

Фиг. 24 показывает действие ежедневного интравагинального применения 0,0, 0,25, 0,5 и 1,0% ДНЕА (Prasterone) в течение 2, 4, 8 и 12 недель на вагинальный pH в постменопаузальных женщинах. Данные выражены в виде средних величин \pm SEM.

Фиг. 25 показывает действие ежедневного интравагинального применения 0,0, 0,25, 0,5 и 1,0% ДНЕА (Prasterone) в течение 2, 4, 8 и 12 недель на изменение тяжести симптома вагинальной атрофии, оцениваемого самими женщинами как наиболее беспокоящий симптом. Величины сравнивают относительно дня 1 и выражают в виде средних величин \pm SEM.

Фиг. 26 показывает действие ежедневного интравагинального применения 0,0, 0,25, 0,5 и 1,0% ДНЕА (Prasterone) в течение 2, 4, 8 и 12 недель на изменение вагинальных секретов, оцениваемое при вагинальном обследовании. Данные выражены в виде средних величин \pm SEM.

Фиг. 27 показывает действие ежедневного интравагинального применения 0,0, 0,25, 0,5 и 1,0% ДНЕА (Prasterone) в течение 2, 4, 8 и 12 недель на изменение цвета вагины, оцениваемое при вагинальном обследовании. Данные выражены в виде средних величин \pm SEM.

Фиг. 28 показывает действие ежедневного интравагинального применения 0,0, 0,25, 0,5 и 1,0% ДНЕА (Prasterone) в течение 2, 4, 8 и 12 недель на изменение целостности вагинального эпителия, оцениваемое при вагинальном обследовании. Данные выражены в виде средних величин \pm SEM.

Фиг. 29 показывает действие ежедневного интравагинального применения 0,0, 0,25, 0,5 и 1,0% ДНЕА (Prasterone) в течение 2, 4, 8 и 12 недель на изменение толщины вагинального эпителия, оцениваемое при вагинальном обследовании. Данные выражены в виде средних величин \pm SEM.

Фиг. 30 показывает средние 24-часовые концентрации в сыворотке ($AUC_{0-24ч}/24$) ДНЕА, 5-диола, ДНЕА-S, E_1 , E_2 и E_1 -S, измеряемые в дни 1 и 7 после введения один раз в день влагалищной овулы (лекарственной формы), содержащей 0,5% ДНЕА. Данные выражены в виде средних величин \pm SEM ($n=10$). Концентрации в сыворотке стероидных гормонов, измеренные в 30-35-летних предменопаузальных женщинах ($n=47$), а также в 55-65-летних постменопаузальных женщинах ($n=369$), добавляли в качестве сылочных данных, которые выражали в виде средних величин и 5-го и 95-го перцентилей (пунктирные линии). *, $p<0,05$, **, $p<0,01$, экспериментальных данных против фона. (Данные из Labrie, Cusan et al. 2008).

Фиг. 31 показывает средние 24-часовые концентрации в сыворотке ($AUC_{0-24ч}/24$) 4-диола, тестостерона, ДНТ ADT-G, 3α -диол-3G и 3α -диол-17G, измеренные в дни 1 и 7 после введения один раз в день влагалищной овулы (лекарственной формы), содержащей 0,5% ДНЕА. Данные выражены в виде средних величин \pm SEM ($n=10$). Концентрации в сыворотке стероидных гормонов, измеренные в 30-35-летних предменопаузальных женщинах ($n=47$) и в 55-65-летних постменопаузальных женщинах ($n=369$), добавляли в качестве сылочных данных, которые выражали в виде средних величин и 5-го и 95-го перцентилей (пунктирные линии). *, $p<0,05$, **, $p<0,01$, экспериментальных данных против фона. (Данные из Labrie, Cusan et al., 2008).

Подробное описание изобретения

Ниже представлен перечень статей, обсуждаемых здесь в виде цитирования в краткой форме:

Allen, Loyd V Jr, Worthen Dennis B, and Mink Bill, in Suppositories, Chapter 3 pages

27-49, Published by the Pharmaceutical Press, London, UK, 2008.

Archer, D. F. (2007). "Drospirenone-containing hormone therapy for postmenopausal

women. Perspective on current data." *J Reprod Med* 52(2 Suppl): 159-64.

Ayton, R. A., G. M. Darling, et al. (1996). "A comparative study of safety and efficacy of continuous low dose oestradiol released from a vaginal ring compared with conjugated equine oestrogen vaginal cream in the treatment of postmenopausal urogenital atrophy." *Br J Obstet Gynaecol* 103(4): 351-8.

Bachmann, G., R. A. Lobo, et al. (2008). "Efficacy of low-dose estradiol vaginal tablets in the treatment of atrophic vaginitis: a randomized controlled trial." *Obstet Gynecol* 111(1): 67-76.

Bachmann, G. A., M. Notelovitz, et al. (1992). "Long-term non-hormonal treatment of vagina dryness." *J Clin Pract Sex* 8.

Baker, V. L. and R. B. Jaffe (1996). "Clinical uses of antiestrogens." *Obstet Gynecol Surv* 51: 45-59.

E. E. Baulieu, G. Thomas, S. Legrain, N. Lahlou, M. Roger, B. Debuire, V. Faucounau, L. Girard, M.P. Hervy, F. Latour, M.C. Leaud, A. Mokrane, H. Pitti-Ferrandi, C. Trivalle, O. de Lacharriere, S. Nouveau, B. Rakoto-Arison, J.C. Souberbielle, J. Raison, Y. Le Bouc, A. Raynaud, X. Girerd and F. Forette, Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000), pp. 4279-4284.

Baxendale, P. M., M. J. Reed, et al. (1981). "Inability of human endometrium or myometrium to aromatize androstenedione." *J Steroid Biochem* 14(3): 305-6.

Belanger, B. Candas, A. Dupont, L. Cusan, P. Diamond, J.L. Gomez and F. Labrie, Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80- year-old men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (1994), pp. 1086-1090.

Belanger, G. Pelletier, F. Labrie, O. Barbier and S. Chouinard, Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans, *Trends Endocrinol. Metab.* 14 (2003), pp. 473-479.

Beral, V. (2003). "Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study." *Lancet* 362(9382): 419-27.

Beral, V., D. Bull, et al. (2005). "Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study." *Lancet* 365(9470): 1543-51.

Berger, L., M. El-Alfy, et al. (2005). "Effects of dehydroepiandrosterone, Premarin and Acolbifene on histomorphology and sex steroid receptors in the rat vagina." *J Steroid Biochem Mol Biol* 96(2): 201-15.

Bulun, S. E., Z. Lin, et al. (2005). "Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment." *Pharmacol Rev* 57(3): 359-83.

J.E. Buster, P.R. Casson, A. B. Straughn, D. Dale, E. S. Umstot, N. Chiamori and G. E. Abraham, Postmenopausal steroid replacement with micronized dehydroepiandrosterone: preliminary oral bioavailability and dose proportionality studies, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166 (1992), pp. 1163-1168 discussion 1168-1170.

Chlebowski, R. T., S. L. Hendrix, et al. (2003). "Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial." *Jama* 289(24): 3243-53.

D. L. Coleman, E.H. Leiter and R.W. Schwizer, Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetic mice, *Diabetes* 31 (1982), pp. 830-833.

Colditz, G. A., K. M. Egn, et al. (1993). "Hormone replacement therapy and risk of breast cancer: results from epidemiologic studies." *Am. J. Obstet. Gynecol.* 168: 1473-1480.

Colditz, G. A., S. E. Hankinson, et al. (1995). "The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women." *N. Engl. J. Med.* 332: 1589-1593.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997). "Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer." *Lancet* 350(9084): 1047-59.

Corrao, G., A. Zambon, et al. (2008). "Menopause hormone replacement therapy and cancer risk: an Italian record linkage investigation." *Ann Oncol* 19(1): 150-5.

Coughlin, S. S., A. Giustozzi, et al. (2000). "A meta-analysis of estrogen replacement therapy and risk of epithelial ovarian cancer." *J Clin Epidemiol* 53(4): 367-75.

Deutsch, S., R. Ossowski, et al. (1981). "Comparison between degree of systemic absorption of vaginally and orally administered estrogens at different dose levels in postmenopausal women." *Am J Obstet Gynecol* 139(8): 967-8.

Dew, J. E., B. G. Wren, et al. (2003). "A cohort study of topical vaginal estrogen therapy in women previously treated for breast cancer." *Climacteric* 6(1): 45-52.

P. Diamond, L. Cusan, J.L. Gomez, A. Belanger and F. Labrie, Metabolic effects of 12-month percutaneous DHEA replacement therapy in postmenopausal women, *J. Endocrinol.* 150 (1996), pp. S43-S50.

Dugal, R., K. Hesla, et al. (2000). "Comparison of usefulness of estradiol vaginal tablets and estriol vagitories for treatment of vaginal atrophy." *Acta Obstet Gynecol Scand* 79(4): 293-7.

Englund, D. E. and E. D. Johansson (1978). "Plasma levels of oestrone, oestradiol and gonadotrophins in postmenopausal women after oral and vaginal administration of conjugated equine oestrogens (Premarin)." *Br J Obstet Gynaecol* 85(12): 957-64.

Fallowfield, L., D. Cella, et al. (2004). "Quality of life of postmenopausal women in the

Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) Adjuvant Breast Cancer Trial." *J Clin Oncol* 22(21): 4261-71.

Feeley, K. M. and M. Wells (2001). "Hormone replacement therapy and the endometrium." *J Clin Pathol* 54(6): 435-40.

Furuhjelm, M., E. Karlgren, et al. (1980). "Intravaginal administration of conjugated estrogens in premenopausal and postmenopausal women." *Int J Gynaecol Obstet* 17(4): 335-9.

Galhardo, C. L., J. M. Soares, Jr., et al. (2006). "Estrogen effects on the vaginal pH, flora and cytology in late postmenopause after a long period without hormone therapy." *Clin Exp Obstet Gynecol* 33(2): 85-9.

Gambrell, R. D., Jr., F. M. Massey, et al. (1980). "Use of the progestogen challenge test to reduce the risk of endometrial cancer." *Obstet Gynecol* 55(6): 732-8.

Garg, P. P., K. Kerlikowske, et al. (1998). "Hormone replacement therapy and the risk of epithelial ovarian carcinoma: a meta-analysis." *Obstet Gynecol* 92(3): 472-9.

Grady, D., T. Gebretsadik, et al. (1995). "Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis." *Obstet Gynecol* 85(2): 304-13.

Gupta, P., B. Ozel, et al. (2008). "The effect of transdermal and vaginal estrogen therapy on markers of postmenopausal estrogen status." *Menopause* 15(1): 94-7.

Holmberg, L. and H. Anderson (2004). "HABITS (hormonal replacement therapy after breast cancer--is it safe?), a randomised comparison: trial stopped." *Lancet* 363(9407): 453-5.

Holmberg, L., O. E. Iversen, et al. (2008). "Increased risk of recurrence after hormone replacement therapy in breast cancer survivors." *J Natl Cancer Inst* 100(7): 475-82.

Holmgren, P. A., M. Lindskog, et al. (1989). "Vaginal rings for continuous low-dose release of oestradiol in the treatment of urogenital atrophy." *Maturitas* 11(1): 55-63.

Hulley, S. B. (2002). "Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and estrogen/progestin replacement study follow-up (HERS H)." *JAMA* 288: 58-66.

Jick, S. S., A. M. Walker, et al. (1993). "Estrogens, progesterone, and endometrial cancer." *Epidemiology* 4(1): 20-4.

C.C. Johnston Jr., S.L. Hui, R.M. Witt, R. Appledorn, R.S. Baker and C. Longcope, Early menopausal changes in bone mass and sex steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61 (1985), pp. 905-911.

D. W. Hum, A. Belanger, E. Levesque, O. Barbier, M. Beaulieu, C. Albert, M. Vallee, C. Guillemette, A. Tchernof, D. Turgeon and S. Dubois, Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69 (1999), pp. 413-423.

H. Kawano, H. Yasue, A. Kitagawa, N. Hirai, T. Yoshida, H. Soejima, S. Miyamoto, M. Nakano and H. Ogawa, Dehydroepiandrosterone supplementation improves endothelial function and insulin sensitivity in men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003), pp. 3190-3195.

Kendall, A., M. Dowsett, et al. (2006). "Caution: Vaginal estradiol appears to be contraindicated in postmenopausal women on adjuvant aromatase inhibitors." *Ann Oncol* 17(4): 584-7.

Kvorning, J. D. N. and H. K. Jensen (1986). Pharmaceutical development of low-dose estradiol vaginators. International Workshop, Copenhagen.

Labrie, C, A. Belanger, et al. (1988). "Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate." *Endocrinology* 123: 1412-1417.

Labrie, F. (1991). "Intracrinology." *Mol. Cell. Endocrinol.* 78: C113-C118.

F. Labrie, Future perspectives of SERMs used alone and in combination with DHEA, *Endocr. Relat. Cancer* 13 (2006), pp. 335-355.

Labrie, F. (2007). "Drug Insight: breast cancer prevention and tissue-targeted hormone replacement therapy." *Nature Clinical Practice, Endocrinology & Metabolism* 3(8): 584-593.

F. Labrie, A. Belanger, J. Simard, V. Luu-The and C. Labrie, DHEA and peripheral androgen and estrogen formation: intracrinology, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 774 (1995), pp. 16-28.

Labrie, F., A. Belanger, et al. (2007). "Metabolism of DHEA in postmenopausal women following percutaneous administration." *J Steroid Biochem Mol Biol* 103(2): 178-88.

Labrie, F., A. Belanger, et al. (2007) "Bioavailability and metabolism of oral and percutaneous dehydroepiandrosterone in postmenopausal women" *J Steroid Biochem Mol Biol.* Oct; 107(1-2):57-69.

Labrie, F., A. Belanger, et al. (2006). "Androgen glucuronides, instead of testosterone, as the new markers of androgenic activity in women." *Journal Ster Biochem & Mol Biol* 99: 182-188.

Labrie, F., A. Belanger, et al. (2005). "GnRH agonists in the treatment of prostate cancer." *Endocrine Reviews* 26(3): 361-379.

Labrie, F., A. Belanger, et al. (1997). "Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging." *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2396-2402.

Labrie, F., A. Belanger, et al. (2007a). "Bioavailability and metabolism of oral and percutaneous dehydroepiandrosterone in postmenopausal women." *J Steroid Biochem Mol Biol* 107(1-2): 57-69.

F. Labrie, A. Belanger, P. Belanger, R. Berube, C. Martel, L. Cusan, J. Gomez, B. Candas, V. Chaussade, I. Castiel, C. Deloche and J. Leclaire, Metabolism of DHEA in

postmenopausal women following percutaneous administration, *J. Steroid Biochem. Mol Biol.* 103 (2) (2007b), pp. 178-188.

Labrie, F., L. Cusan, et al. (2008). "Effect of Intravaginal DHEA on Serum DHEA and Eleven of its Metabolites in Postmenopausal Women." *Journal Ster Biochem & Mol Biol*: In press.

Labrie, F., L. Cusan, et al. (2008). "Effect of One-Week Treatment with Vaginal Estrogen Preparations on Serum Estrogen Levels in Postmenopausal Women." *Menopause* In press.

Labrie, F., L. Cusan, et al. (2008). "Changes in serum DHEA and eleven of its metabolites during 12-month percutaneous administration of DHEA." *J Steroid Biochem Mol Biol* 110(1-2): 1-9.

Labrie, F., P. Diamond, et al. (1997). "Effect of 12-month dehydroepiandrosterone replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women." *J Clin Endocrinol Metab* 82(10): 3498-505.

Labrie, F., A. Dupont, et al. (1985). Complete androgen blockade for the treatment of prostate cancer. *Important Advances in Oncology*. V. T. de Vita, S. Hellman and S. A. Rosenberg. Philadelphia, J.B. Lippincott: 193-217.

F. Labrie, V. Luu-The, S.X. Lin, C. Labrie, T. Simard, R. Breton and A. Belanger, The key role of 17 β -HSDs in sex steroid biology, *Steroids* 62 (1997), pp. 148-158.

Labrie, V. Luu-The, S.-X. Lin, J. Simard, C. Labrie, M. El-Alfy, G. Pelletier and A. Belanger, Intracrinology: role of the family of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease, *J. Mol. Endocrinol.* 25 (2000), pp. 1-16.

Labrie, F., V. Luu-The, et al. (2005). "Is DHEA a hormone? Starling Review." *J Endocrinol* 187: 169-196.

Labrie, F., V. Luu-The, et al. (2003). "Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone." *Endocrine Reviews* 24(2): 152-182.

Labrie, F., V. Luu-The, et al. (2006). "Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an anabolic steroid like dihydrotestosterone (DHT), the most potent natural androgen, and tetrahydrogestrinone (THG)." *J Steroid Biochem Mol Biol* 100(1-3): 52-8.

F. Labrie, J. Simard, V. Luu-The, A. Belanger, G. Pelletier, Y. Morel, F. Mebarki, R. Sanchez, F. Durocher, C. Turgeon, Y. Labrie, E. Rheaume, C. Labrie and Y. Lachance, The 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase/isomerase gene family: lessons from type II 3 β -HSD congenital deficiency. In: V. Hansson, F.O. Levy and K. Tasken, Editors, *Signal Transduction in Testicular Cells*. Ernst Schering Research Foundation Workshop, vol Suppl. 2, Springer- Verlag, Berlin (1996), pp. 185-218.

Labrie, J. Simard, V. Luu-The, A. Belanger and G. Pelletier, Structure, function and tissue-specific gene expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissues, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43 (1992), pp. 805-826.

F. Labrie, R. Poulin, J. Simard, V. Luu-The, C. Labrie and A. Belanger, Androgens, DHEA and breast cancer. In: T. Gelf and, Editor, *Androgens and Reproductive Aging*, Taylor and Francis, Oxfordshire, UK (2006), pp. 113-135.

Labrie, Y. Sugimoto, V. Luu-The, J. Simard, Y. Lachance, D. Bachvarov, G. Leblanc, F. Durocher and N. Paquet, Structure of human type II 5 α -reductase, *Endocrinology* 131 (1992), pp. 1571-1573.

Y. Labrie, F. Durocher, Y. Lachance, C. Turgeon, J. Simard, C. Labrie and F. Labrie, The human type II 17 β -hydroxy steroid dehydrogenase gene encodes two alternatively-spliced messenger RNA species, *DNA Cell Biol.* 14 (1995), pp. 849-861.

Lacey, J. V., P. J. Mink, et al. (2002). "Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer." *JAMA* 288: 334-341.

Li, L., S. J. Plummer, et al. (2008). "A common 8q24 variant and the risk of colon cancer: a population-based case-control study." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(2): 339-42.

C.H. Liu, G.A. Laughlin, U.G. Fischer and S.S. Yen, Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women: evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71 (1990), pp. 900-906.

Long, C. Y., C. M. Liu, et al. (2006). "A randomized comparative study of the effects of oral and topical estrogen therapy on the vaginal vascularization and sexual function in hysterectomized postmenopausal women." *Menopause* 13(5): 737-43.

V. Luu-The, I. Dufort, N. Paquet, G. Reimnitz and F. Labrie, Structural characterization and expression of the human dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene, *DNA Cell Biol.* 14 (1995), pp. 511-518.

V. Luu-The, Y. Zhang, D. Poirier and F. Labrie, Characteristics of human types 1, 2 and 3 17 β -hydroxy steroid dehydrogenase activities: oxidation-reduction and inhibition, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 55 (1995), pp. 581-58.

Lyytinen, H., E. Pukkala, et al. (2006). "Breast cancer risk in postmenopausal women using estrogen-only therapy." *Obstet Gynecol* 108(6): 1354-60.

E.G. MacEwen and I.D. Kurzman, Obesity in the dog: role of the adrenal steroid dehydroepiandrosterone (DHEA), *J. Nutr.* 121 (1991), pp. S51-S55.

Mandel, F. P., F. L. Geola, et al. (1983). "Biological effects of various doses of vaginally administered conjugated equine estrogens in postmenopausal women." *J Clin Endocrinol Metab*

57(1): 133-9.

Manonai, J., U. Theppisai, et al. (2001). "The effect of estradiol vaginal tablet and conjugated estrogen cream on urogenital symptoms in postmenopausal women: a comparative study." *J Obstet Gynaecol Res* 27(5): 255-60.

Martin, P. L., S. S. Yen, et al. (1979). "Systemic absorption and sustained effects of vaginal estrogen creams." *Jama* 242(24): 2699-700.

Marx, P., G. Schade, et al. (2004). "Low-dose (0.3 mg) synthetic conjugated estrogens A is effective for managing atrophic vaginitis." *Maturitas* 47(1): 47-54.

Mattson, L. A., G. Culberg, et al. (1989). "Vaginal administration of low dose estradiol-effects on endometrium and vaginal cytology." *Maturitas* 11: 217-222.

R.B. Mazess, On aging bone loss, *Clin. Orthop.* 165 (1982), pp. 239-252.

Meisels, A. (1967). "The maturation value." *Acta Cytol* 11: 249.

Mertens, H. J., M. J. Heineman, et al. (1996). "Androgen receptor content in human endometrium." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 70(1): 11-3.

Mettler, L. and P. G. Olsen (1991). "Long-term treatment of atrophic vaginitis with low-dose oestradiol vaginal tablets." *Maturitas* 14(1): 23-31.

CJ. Migeon, A. R. Keller, B. Lawrence and T.H. Shepart IL, Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human plasma. Effect of age and sex: day-to-day and diurnal variations, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 17 (1957), pp. 1051-1062.

A.J. Morales, J.J. Nolan, J.C. Nelson and S.S. Yen, Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78 (1994), pp. 1360-1367.

Morales, L., P. Neven, et al. (2004). "Acute effects of tamoxifen and third-generation aromatase inhibitors on menopausal symptoms of breast cancer patients." *Anticancer Drugs* 15(8): 753-60.

N.A.M.S. (2007). "Position Statement of the North American Menopause Society." *Menopause* 14: 357-69.

Nachtigall, L. E. (1995). "Clinical trial of the estradiol vaginal ring in the U.S." *Maturitas* 22 Suppl: S43-7.

Naessen, T., K. Rodriguez-Macias, et al. (2001). "Serum lipid profile improved by ultra-low doses of 17-beta-estradiol in elderly women." *J Clin Endocrinol Metab* 86(6): 2757- 62.

Nelson, H. D., K. K. Vesco, et al. (2006). "Nonhormonal therapies for menopausal hot flashes: systematic review and meta-analysis." *Jama* 295(17): 2057-71.

J.E. Nestler, CO. Barlascini, J.N. Clore and W.G. Blackard, Dehydroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat but does not alter insulin sensitivity in

normal men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66 (1988), pp. 57-61.

Nilsson, K. and G. Heimer (1992). "Low-dose oestradiol in the treatment of urogenital oestrogen deficiency--a pharmacokinetic and pharmacodynamic study." *Maturitas* 15(2): 121-7.

Notelovitz, M., S. Funk, et al. (2002). "Estradiol absorption from vaginal tablets in postmenopausal women." *Obstet Gynecol* 99(4): 556-62.

Orentreich, N., J. L. Brind, et al. (1984). "Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59: 551-555.

Pandit, L. and J. G. Ouslander (1997). "Postmenopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis." *Am J Med Sci* 314(4): 228-31.

Persson, L., H. O. Adami, et al. (1989). "Risk of endometrial cancer after treatment with oestrogens alone or in conjunction with progestogens: results of a prospective study." *Bmj* 298(6667): 147-51.

Ponzone, R., N. Biglia, et al. (2005). "Vaginal oestrogen therapy after breast cancer: is it safe?" *Eur J Cancer* 41(17): 2673-81.

Rigg, L. A., H. Hermann, et al. (1978). "Absorption of estrogens from vaginal creams." *N Engl J Med* 298(4): 195-7.

B.L. Riggs, H.W. Wahner, W.L. Dunn, R.B. Mazess, K.P. Offord and L.J. Melton, Differential changes in bone mineral density of the appendicular and axial skeleton with aging: relationship to spinal osteoporosis, *J. Clin. Invest.* 67 (1981), pp. 328-335.

Riman, T., P. W. Dickman, et al. (2002). "Hormone replacement therapy and the risk of invasive epithelial ovarian cancer in Swedish women." *J Natl Cancer Inst* 94: 497-504.

Rinaldi, S., H. Dechaud, et al. (2001). "Reliability and validity of commercially available, direct radioimmunoassays for measurement of blood androgens and estrogens in postmenopausal women." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10(7): 757-65.

Rioux, J. E., C. Devlin, et al. (2000). "17beta-estradiol vaginal tablet versus conjugated equine estrogen vaginal cream to relieve menopausal atrophic vaginitis." *Menopause* 7(3): 156-61.

Rodriguez, C, A. V. Patel, et al. (2002). "Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women." *JAMA* 285: 1460-1465.

Rosenberg, L. U., C. Magnusson, et al. (2006). "Menopausal hormone therapy and other breast cancer risk factors in relation to the risk of different histological subtypes of breast cancer: a case-control study." *Breast Cancer Res* 8(1): R11.

Rossouw, J. E., G. L. Anderson, et al. (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health

Initiative randomized controlled trial." *Jama* 288(3): 321-33.

Salminen, H. S., M. E. Saaf, et al. (2007). "The effect of transvaginal estradiol on bone in aged women: a randomised controlled trial." *Maturitas* 57(4): 370-81.

Schiff, L., D. Tulchinsky, et al. (1977). "Vaginal absorption of estrone and 17beta-estradiol." *Fertil Steril* 28(10): 1063-6.

Schmidt, G., S. B. Andersson, et al. (1994). "Release of 17-beta-oestradiol from a vaginal ring in postmenopausal women: pharmacokinetic evaluation." *Gynecol Obstet Invest* 38(4): 253-60.

E.D. Schriock, CK. Buffington, G.D. Hubert, B.R. Kurtz, A.E. Kitabchi, J.E. Buster and J. R. Givens, Divergent correlations of circulating dehydroepiandrosterone sulfate and testosterone with insulin levels and insulin receptor binding, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66 (1988), pp. 1329-1331.

Sillero-Arenas, M., M. Delgado-Rodriguez, et al. (1992). "Menopausal hormone replacement therapy and breast cancer: a meta-analysis." *Obstet. Gynecol.* 79: 286-294.

Simon, J. A., K. Z. Reape, et al. (2007). "Randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the efficacy and safety of synthetic conjugated estrogens B for the treatment of vulvovaginal atrophy in healthy postmenopausal women." *Fertil Steril* In press.

E.R. Simpson, Role of aromatase in sex steroid action, *J. Mol. Endocrinol.* 25 (2000), pp. 149-156.

Simunic, V., I. Banovic, et al. (2003). "Local estrogen treatment in patients with urogenital symptoms." *Int J Gynaecol Obstet* 82(2): 187-97.

Smith, D. C., R. Prentice, et al. (1975). "Association of exogenous estrogen and endometrial carcinoma." *N. Engl. J. Med.* 293: 1164-1167.

Smith, P., G. Heimer, et al. (1993). "Oestradiol-releasing vaginal ring for treatment of postmenopausal urogenital atrophy." *Maturitas* 16(2): 145-54.

Sourla, A., M. Flamand, et al. (1998). "Effect of dehydroepiandrosterone on vaginal and uterine histomorphology in the rat." *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 66(3): 137-149.

Steinberg, K. K., S. B. Thacker, et al. (1991). "A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer." *JAMA* 265: 1985-1990.

K.K. Steinberg, L.W. Freni-Titulaer, E.G. DePuey, D.T. Miller, D.S. Sgoutas, C.H. Coralli, D. L. Phillips, T.N. Rogers and R.V. Clark, Sex steroids and bone density in premenopausal and perimenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69 (1989), pp. 533-539.

Suckling, J., A. Lethaby, et al. (2006). "Local oestrogen for vaginal atrophy in postmenopausal women." *Cochrane Database System Rev* 18(4): CD001500.

Swanson, M. Lorentzon, L. Vandenput, D. Mellstrom, F. Labrie, A. Rane, J. Jakobsson, C. Ohlsson, UGT2B7 H268Y polymorphism is associated with serum sex steroid levels and cortical bone size in young adult men, *JCEM* (2007), in press.

Tchernof, J.P. Despres, A. Belanger, A. Dupont, D. Prud'homme, S. Moorjani, P.J. Lupien and F. Labrie, Reduced testosterone and adrenal C19 steroid levels in obese men, *Metabolism* 44 (1995), pp. 513-519.

Turgeon, J.S. Carrier, E. Levesque, D.W. Hum and A. Belanger, Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members, *Endocrinology* 142 (2001), pp. 778-787.

Utian, W. H., D. Shoupe, et al. (2001). "Relief of vasomotor symptoms and vaginal atrophy with lower doses of conjugated equine estrogens and medroxyprogesterone acetate." *Fertil Steril* 75(6): 1065-79.

Vermeulen and L. Verdonck, Radioimmunoassays of 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one, 4-androstene-3,17-dione, dehydroepiandrosterone, 17 β -hydroxyprogesterone and progesterone and its application to human male plasma, *J. Steroid Biochem.* 7 (1976), pp. 1-10.

D.T. Villareal and J.O. Holloszy, Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men: a randomized controlled trial, *JAMA* 292 (2004), pp. 2243-2248.

Voigt, L. F., N. S. Weiss, et al. (1991). "Progestagen supplementation of exogenous oestrogens and risk of endometrial cancer." *Lancet* 338(8762): 274-7.

Weisberg, E., R. Ayton, et al. (2005). "Endometrial and vaginal effects of low-dose estradiol delivered by vaginal ring or vaginal tablet." *Climacteric* 8(1): 83-92.

Wied, G. L. (1993). "Industrial developments in automated cytology as submitted by their developers." *Anal Quant Cytol Histol* 15(5): 358-70.

Wines, N. and E. Willstead (2001). "Menopause and the skin." *Australas J Dermatol* 42(3): 149-8; quiz 159.

Zang, H., L. Sahlin, et al. (2007). "Effects of testosterone treatment on endometrial proliferation in postmenopausal women." *J Clin Endocrinol Metab* 92(6): 2169-75.

B. Zumoff, G.W. Strain, L.K. Miller and W. Rosner, Twenty-four-hour mean plasma testosterone concentration declines with age in normal premenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (1995), pp. 1429-1430.

Вагинальная сухость обнаруживается в 75% постменопаузальных женщин (Wines and Willstead 2001; N.A.M.S. 2007). Вследствие различных причин, в частности опасности осложнений, вызываемых эстрогенами, только 20-25% симптоматических женщин с вагинальной атрофией стремятся к медицинскому лечению (Pandit and Ouslander 1997; N.A.M.S. 2007). Таким образом, существует явная медицинская потребность и основная благоприятная возможность улучшения качества жизни большей популяции женщин, страдающих от вагинальной атрофии в течение большей части их продолжительности жизни. Можно упомянуть о том, что, хотя приступообразные ощущения жара ("приливы") уменьшаются самопроизвольно со временем, симптомы вагинальной атрофии, а именно, вагинальная сухость, вульво-вагинальное раздражение/зуд и диспареуния со временем увеличиваются в их тяжести в отсутствие лечения.

На основе хорошо известного факта, что секреция эстрогена яичниками прекращается во время менопаузы, системные и локальные эстрогены были до сих пор единственным подходом для лечения вагинальной атрофии. Однако, было показано, что системные эстрогены+прогестин (HRT) и только эстрогены (ERT) увеличивают риск рака молочной железы (Steinberg, Thacker et al., 1991; Sillero-Arenas, Delgado-Rodriguez et al., 1992; Colditz, Egn et al., 1993; Colditz, Hankinson et al., 1995; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 1997; Hulley 2002; Beral 2003; Chlebowski, Hendrix et al., 2003; Holmberg and Anderson 2004; Lyytinen, Pukkala et al., 2006; Corrao, Zamboni et al., 2008; Holmberg, Iversen et al., 2008; Li, Plummer et al., 2008), рака яичника (Garg, Kerlikowske et al., 1998; Coughlin, Giustozzi et al., 2000; Lacey, Mink et al., 2002; Riman, Dickman et al., 2002; Rodriguez, Patel et al., 2002; Rossouw, Anderson et al., 2002; Lyytinen, Pukkala et al., 2006), а также эндометриального рака (только эстрогены) (Gambrell, Massey

et al., 1980; Persson, Adami et al., 1989; Voigt, Weiss et al., 1991; Jick, Walker et al., 1993; Grady, Gebretsadik et al., 1995; Beral, BuU et al., 2005). Гласность с последующим инициативным исследованием здоровья женщины (Rossouw, Anderson et al., 2002) оказали сильнейшее действие, поставив под сомнение безопасность доступных способов лечения менопаузальных симптомов (Archer 2007).

Хотя были разработаны интравагинальные препараты для устранения системного подвѣргания действию эстрогенов, продолжительный ряд исследований единогласно продемонстрировал, что все интравагинальные препараты эстрогенов приводят к относительно высоким уровням эстрогенов, измеряемым непосредственно или посредством их системных эффектов (Englund and Johansson 1978; Rigg/Hermann et al., 1978; Martin, Yen et al., 1979; Furuholm, Karlgren et al., 1980; Deutsch, Ossowski et al., 1981; Mandel, Geola et al., 1983; Nilsson and Heimer 1992; Nachtigall 1995; Ayton, Darling et al., 1996; Dugal, Hesla et al., 2000; Rioux, Devlin et al., 2000; Manonai, Theppisai et al., 2001; Notelovitz, Funk et al., 2002; Ponzzone, Biglia et al., 2005; Weisberg, Ayton et al., 2005; Galhardo, Soares et al., 2006; Kendall, Dowsett et al., 2006; Long, Liu et al., 2006; Bachmann, Lobo et al., 2008). Эти данные, показывающие значительное увеличение уровня эстрогена, ясно указывают на то, что применение интравагинальных препаратов эстрогена также потенциально ассоциировано с увеличенным риском рака молочной железы и рака матки (Kvornning and Jensen 1986; Mattson, Culberg et al. 1989; Rosenberg, Magnusson et al., 2006; N.A.M.S. 2007). Фактически была официально высказана обеспокоенность в отношении стимулирующих эффектов вагинальных препаратов эстрогена на эндометрии ((N.A.M.S. 2007).

Наиболее ранние измерения уровней эстрадиола (E_2) сыворотки после интравагинального введения эстрогенов использовали радиоиммуноанализы, технологию, лишенную специфичности, точности, достоверности и чувствительности (Rinaldi, Dechaud et al., 2001). Авторы данного изобретения измеряли эстрогены сыворотки с использованием GLP (Good Laboratory Practice)-валидизированные масс-спектрометрических анализов после интравагинального введения двух наиболее обычных препаратов эстрогенов (Labrie, Cusan et al., 2008). Это исследование смогло окончательно показать, что как пилюля E_2 (25 мкг E_2 /день), так и крем конъюгированных эстрогенов (1 г 0,625 мг-конъюгированных эстрогенов/день), после одной недели обработки один раз в день, вызывали приблизительно 5-кратное увеличение сывороточного E_2 в постменопаузальных женщинах. Такие данные указывают на то, что действия эстрогенов, наносимых локально в вагину, вряд ли ограничиваются этой вагиной и что ожидается системное действие, как предполагалось ранее (Englund and Johansson 1978; Rigg, Hermann et al., 1978; Martin, Yen et al., 1979; Furuholm, Karlgren et al., 1980; Deutsch, Ossowski et al., 1981; Mandel, Geola et al., 1983; Nilsson and Heimer 1992; Nachtigall 1995; Ayton, Darling et al., 1996; Dugal, Hesla et al., 2000; Rioux, Devlin et al., 2000; Manonai, Theppisai et al., 2001; Notelovitz, Funk et al., 2002; Ponzzone, Biglia et al., 2005; Weisberg, Ayton et al., 2005; Galhardo, Soares et al., 2006; Kendall, Dowsett et al., 2006; Long, Liu et al., 2006; Bachmann, Lobo et al., 2008).

Кроме вышеуказанных озабоченностей в отношении безопасности эстрогенов, вводимых как системно, так и локально, недавние данные ясно продемонстрировали, что женщины не только имеют дефицит эстрогенов во время менопаузы, но что они также были прогрессирующим образом, начиная с тридцати лет, лишены андрогенов, производимых в специфических периферических тканях-мишенях посредством интракринального превращения дегидроэпиандростерона (DHEA) в андрогены и/или эстрогены (Labrie, Belanger et al., 1988; Labrie 1991; Labrie, Luu-The et al., 2003; Labrie, Luu-The et al., 2005). Действительно, DHEA и DHEA-сульфат сыворотки прогрессирующим образом уменьшаются от максимума, наблюдаемого в возрасте 30 лет (Orentreich, Brind et al., 1984; Labrie, Belanger et al., 1997; Labrie, Luu-The et al., 2003), до величины на 60% более низкой во время менопаузы (Labrie, Belanger et al., 2006).

Что касается роли андрогенов в женщинах, важно упомянуть, что женщины секретируют 50% андрогенов в сравнении с наблюдаемым уровнем в мужчинах (Labrie, Belanger et al., 1997; Labrie, Luu-The et al., 2005). Поскольку DHEA сыворотки является преобладающим источником андрогенов, которые выполняют ряд физиологических функций в женщинах (Labrie, Luu-The et al., 2003; Labrie 2007), 60% уменьшение циркулирующего DHEA, обнаруживаемое уже по время менопаузы, приводит к сходному 60% увеличению общего пула андрогенов (Labrie, Belanger et al., 2006) с получением потенциальных признаков и симптомов гипоандрогенности в кости, мышцах, молочной железе, вагине, головном мозге, а также в метаболизме глюкозы, инсулина и липидов (Labrie, Luu-The et al., 2003; Labrie 2007). Недавние данные показали, что среди этих андрогенных тканей-мишеней, вагина является чувствительной к андрогенам после введения DHEA в крысе с благоприятными действиями не только на поверхностный эпителиальный слой вагины, но также на коллагеновые волокна в lamina propria (собственной пластинке слизистой оболочки) и на muscularis (мышечную пластинку слизистой оболочки) (Berger, El-Alfy et al., 2005).

На основании результатов преклинических исследований авторов (Sourla, Flamand et al., 1998; Berger, El-Alfy et al., 2005) и клинических исследований авторов (Labrie, Diamond et al., 1997; Labrie, Cusan et al., 2008), показывающих благоприятные действия на вагине DHEA, вводимого подкожно или локально, данное клиническое исследование является поисковым (перспективным) рандомизированным и плацебо-контролируемым исследованием действия трех доз интравагинального DHEA, вводимого один раз в день в течение 12 недель, на изменения поверхностных и парабазальных клеток, pH и наиболее беспокоящий

симптом вагинальной атрофии в качестве первичных целей. Эти результаты ясно показывают, что локально вводимый DHEA является очень эффективным и быстрым в коррекции всех признаков и симптомов вагинальной атрофии, причем почти максимальное действие достигается уже при 2 неделях при дозе DHEA, не вызывающей значимого изменения в эстрогенах или андрогенах, тогда как все другие стероидные гормоны остаются неизменными или находящимися вполне в пределах диапазона, обнаруживаемого в здоровых постменопаузальных женщинах.

При введении DHEA локально в вагину, полезные действия эстрогенов и андрогенов, производимых локально в вагине, достигаются без какого-либо значимого высвобождения эстрадиола или тестостерона в кровь (Labrie, Cusan et al., J. Ster. Biochem. Mol. Biol. In press). В образовании андрогенов и/или эстрогенов из DHEA посредством процесса интракринологии, любая ткань является непредсказуемой, так как эта реакция зависит от активности ферментативного аппарата, конкретно присутствующего в каждой клетке каждой ткани. Таким образом, невозможно предсказать, из андрогенов и эстрогенов, которые продуцируются из DHEA в одной ткани, степень, до которой сходные андрогены и эстрогены могут продуцироваться в другой ткани.

Результаты клинического исследования ERC-210 (пример 3) ясно демонстрируют впервые, что локальное введение DHEA в качестве заместительной терапии с предшественником гормона (HPRT) является высокоэффективным и быстрым в коррекции всех симптомов и признаков вагинальной атрофии в постменопаузальных женщинах. Наиболее важно, что это достигается при дозе (0,5%) DHEA, которая не увеличивает уровни в сыворотке активных эстрогенов и андрогенов, и без изменений или с минимальными изменениями сывороточного DHEA и каких-либо его метаболитов, все из которых остаются вполне в пределах диапазона величин, обнаруживаемых в здоровых постменопаузальных женщинах (Labrie, Cusan et al., 2008).

Хотя 75% постменопаузальных женщин страдают от вагинальной атрофии (Wines and Willstead 2001; N.A.M.S. 2007), влияющей, следовательно, на качество их жизни во время большей части их продолжительности жизни, только 20% обращаются за лечением. (Pandit and Ouslander 1997). Боязнь рака молочной железы, связанного с увеличенными уровнями эстрогенов в крови, является основной предполагаемой причиной. Поскольку секреция эстрогена в системный кровоток происходит исключительно из яичников и прекращается при менопаузе, введение эстрогенов постменопаузальным женщинам, по видимому, не является физиологическим. После WHI, научной проблемой является исследование альтернативных типов и препаратов гормональной терапии, которые могли бы обеспечить все постменопаузальные преимущества эстрогенов с улучшением качества жизни женщин, минимизацией рисков и максимизацией пользы (Archer 2007). Поскольку терапии на основе не-эстрогенов не показали убедительной эффективности (Nelson, Vesco et al., 2006; Suckling, Lethaby et al., 2006), женщины и их врачи остались без безопасного способа лечения вагинальной атрофии.

Различные формы эстрогенов являются эффективными в лечении вульвовагинальной атрофии (Pandit and Ouslander 1997; Utian, Shoupe et al., 2001). Действительно, вагинальная таблетка E₂ показала эффективность, подобную эффективности вагинального кольца E₂ (Weisberg, Ayton et al., 2005), а также крема конъюгированного эстрогена (Rioux, Devlin et al. 2000; Manonai, Theppisai et al., 2001).

Эта новая HPRT находится в заметном контрасте с 5-кратным увеличением в сыворотке E₂, измеряемого масс-спектрометрией после лечения интравагинальным E₂ или конъюгированными эстрогенами (Labrie, Cusan et al., 2008). Эти недавние результаты в отношении сывороточных эстрогенов подтверждают длинный ряд исследований, показывающих, что все препараты интравагинального эстрогена приводят к повышенным концентрациям сывороточного эстрогена, измеряемого непосредственно радиоиммуноанализами или через их системные эффекты (Englund and Johansson 1978; Rigg, Hermann et al., 1978; Martin, Yen et al., 1979; Furuholm, Karlgren et al., 1980; Deutsch, Ossowski et al., 1981; Mandel, Geola et al., 1983; Nilsson and Heimer 1992; Nachtigall 1995; Ayton, Darling et al., 1996; Dugal, Hesla et al., 2000; Rioux, Devlin et al., 2000; Manonai, Theppisai et al., 2001; Notelovitz, Funk et al., 2002; Ponzzone, Biglia et al., 2005; Weisberg, Ayton et al., 2005; Galhardo, Soares et al., 2006; Kendall, Dowsett et al., 2006; Long, Liu et al., 2006; Bachmann, Lobo et al., 2008).

Наиболее обычными вредными событиями, сообщенными при использовании вагинальных эстрогенов, являются вагинальное кровотечение и боль в молочных железах, оба из которых являются вторичными относительно увеличенных сывороточных эстрогенов (Suckling, Lethaby et al., 2006). Эти побочные эффекты сообщались для E₂-кольца, крема конъюгированных эстрогенов, а также таблетки E₂ (Ayton, Darling et al. 1996; Weisberg, Ayton et al., 2005). Как упоминалось выше, существует также озабоченность в отношении стимулирующих действий вагинальных эстрогенов на эндометрий (N.A.M.S. 2007). Маточное кровотечение, боль в молочных железах и перинеальная боль сообщались в 9% женщин, которые принимали вагинальную таблетку в течение 24 недель, тогда как 34% жаловались на эти же симптомы в группе с вагинальным кремом конъюгированного эстрогена (Rioux, Devlin et al., 2000). Suckling, Lethaby et al., 2006 сообщали об отсутствии различий между разными вагинальными препаратами эстрогенов.

Хорошо известно, что атрофический вагинит в постменопаузальных женщинах мог быть ухвачен или индуцирован применением ингибиторов ароматазы для лечения рака молочной железы. Действительно, эти лекарственные средства обнаруживают их преимущества в случае рака молочной железы

уменьшением биосинтеза E_2 во всех тканях с увеличением посредством этого частоты и тяжести климактерических симптомов (Fallowfield, Cella et al., 2004; Morales, Neven et al., 2004). В недавнем исследовании, где семь пациенток с раком молочной железы, которых лечили ингибиторами ароматазы, получали Вагифем при суточной дозе 25 мкг в течение 2 недель и затем, после этого, два раза в неделю, сывороточный E_2 увеличивался с медианы 3 пмоль/л до 72 пмоль/л, при 2 неделях (диапазон 3 - 232) (Kendall, Dowsett et al., 2006). Сывороточные уровни E_2 обычно уменьшались после этого до величин 40 пмоль/л или менее, хотя при неделях 7-10 были обнаружены величины 137 и 219 пмоль/л. Пациентка, которая получала крем Премарин, имела сывороточные уровни E_2 83 пмоль/л при 2 неделях. Следует упомянуть, что взятие проб крови для измерения E_2 выполняли во время визита пациентки, так что тайминг, вероятно, не соответствовал наивысшим сывороточным уровням E_2 после введения Вагифема. Следовательно, более вероятно, что величины, сообщенные в статье Kendall, Dowsett et al., 2006, недооценивают, до неизвестной степени, истинное повышение сывороточного E_2 после введения интравагинальной пиллюли Вагифема или крема Премарина. Эти авторы сделали вывод, что применение Вагифема с ингибиторами ароматазы является противопоказанным. Эти открытия, полученные на женщинах, лечившихся ингибиторами ароматазы, поднимают серьезную проблему в отношении применения любого вагинального, а также любого перорального или трансдермального препарата эстрогена в постменопаузальных женщинах.

Относительно высокое повышение сывороточного E_2 после лечения различными вагинальными препаратами эстрогенов, приводящее к увеличенному риску рака молочной железы, является широко признаваемой проблемой (Rosenberg, Magnusson et al., 2006). Хотя исследование, имеющее малое число событий и короткий мониторинг (подгруппа 4,7% среди 1472 женщин), не обнаружило статистически значимого различия в периоде ремиссии в подгруппе женщин, которые использовали вагинальный эстроген (Dew, Wren et al., 2003), не кажется разумным или приемлемым увеличение сывороточных уровней E_2 во время терапии рака молочной железы, когда целью лечения ингибиторами ароматазы является именно достижение максимального ингибирования биосинтеза E_2 .

В одном раннем исследовании с Вагифемом, таблетка E_2 , при введении в дозе 25 мкг, приводила к сывороточным уровням E_2 80 пмоль/л с величинами, меньшими 50 пмоль/л при 14 ч и позже (Kvorning and Jensen 1986). В более недавнем исследовании с Вагифемом, максимальные и средние сывороточные концентрации E_2 при 24 ч при измерении были равны 180 ± 99 пмоль/л и 84 пмоль/л для дозы 25 мкг, тогда как величины 81 ± 62 пмоль/л и 40 пмоль/л, соответственно, были обнаружены для дозы 10 мкг (Nitelovitz, Funk et al., 2002). Другие вагинальные таблетки и кремы эстрогенов приводили даже к более высоким уровням сывороточных эстрогенов (Schiff, Tulchinsky et al., 1977; Rioux, Devlin et al., 2000).

С вагинальными таблетками 10 мкг и 25 мкг E_2 было обнаружено, что сывороточный E_2 увеличивался до максимальных величин приблизительно 90 и 160 пмоль/л, соответственно, от фоновых величин приблизительно 35 пмоль/л (Nilsson and Heimer 1992). Сообщался сывороточный E_2 с Вагифемом при $C_{\text{макс}}$ 51 ± 34 пг/мл в день 1, причем эта величина является практически неизменной в дни 14 (47 ± 21 пг/мл) и 84 (49 ± 27 пг/мл) (Vagifem, Physician Package Insert 1999).

В другом исследовании, сообщалось, что после 52 недель лечения 25 мкг Вагифема сывороточные уровни E_2 оставались неизменными от $10,3 \pm 21,5 - 9,9$ пг/мл (Bachmann, Lobo et al., 2008). Такие результаты могут объясняться тем фактом, что взятие проб крови выполняли, наиболее вероятно, спустя 3 или 4 дня после применения Вагифема. Важно также упомянуть, что повышенные сывороточные уровни E_2 в этом исследовании, наиболее вероятно, связаны с отсутствием специфичности используемых иммуноанализов, так как нормальные сывороточные уровни E_2 , измеряемые масс-спектрометрией в постменопаузальных женщинах, являются в два-три раза более низкими (Labrie, Belanger et al., 2006).

В одном раннем исследовании, пероральное и вагинальное введение 1,25 мг Премарина приводило к сывороточным уровням E_2 и эстрона по меньшей мере до 100 и 1000 пг/мл, соответственно, во время 24 ч после введения, причем эти уровни являются несколько более высокими после вагинального введения. Сывороточные уровни гонадотропина уменьшались в большинстве субъектов (Englund and Johansson 1978). Сходные результаты сообщались (Rigg, Hermann et al., 1978). В одном недавнем исследовании, после 3 месяцев ежедневного перорального или интравагинального введения 0,625 мг Премарина, сывороточные уровни E_2 увеличивались до 83,1 и 58,6 пг/мл, соответственно (Long, Liu et al., 2006), иллюстрируя посредством этого очень важное системное воздействие как после интравагинального, так и после перорального введения эстрогена, так как сывороточный E_2 был только на 36% более низким после интравагинального введения в сравнении с пероральным введением конъюгированных эстрогенов. В 12-недельном исследовании с вагинальным кремом Премарином при суточной дозе 2 г, три раза в неделю, 21% женщин испытывали кровотечение после теста прогестогена (Nachtigall 1995). Кроме того, из этих женщин, 12% показали увеличение толщины эндометрия при эхографии.

При применении вагинального кольца не сообщалось увеличение сывороточных уровней E_1 , E_2 или E_3 (Nachtigall 1995; Gupta, Ozel et al., 2008), хотя значимые увеличения E_1 -S и E_2 наблюдали в женщинах в возрасте более 60 лет (Naessen, Rodriguez-Macias et al., 2001). В группе EST-кольца недавнего исследования, сывороточный E_2 увеличивался от 16 ± 22 пмоль/л до 49 ± 64 пмоль/л при неделе 24 (Weisberg, Au-

ton et al., 2005). В группе Вагифема, с другой стороны, сывороточный E_2 увеличивался от 15 ± 33 пмоль/л до 36 ± 51 пмоль/л. Тем не менее, эти авторы сообщали, что сывороточный E_2 оставался в пределах или вблизи величин, обнаруживаемых в здоровых постменопаузальных женщинах. При 48 неделях лечения с использованием EST-кольца или Vagifem, 30-32% жаловались на частоту мочеиспускания и 18-33% жаловались на диспареунию (Weisberg, Ayton et al., 2005).

Три исследования документировали, что вагинальное кольцо E_2 делает возможным низкий сывороточный E_2 во время 90-дневного периода, за исключением "вспышки" сывороточного эстрогена, который достигает более низкой области всплесков, наблюдаемых в женщинах с нормальным менструальным циклом, или 100-200 пмоль/л во время первых 0,5-8 ч после вставления кольца (Holmgren, Lindskog et al., 1989; Schmidt, Andersson et al., 1994) (Baker and Jaffe 1996). То, что суточная доставка 7,5 мкг E_2 интравагинальным способом, имеет системные действия, показано наблюдением значимого увеличения плотности минеральных веществ в костях всего бедра и поясничной области позвоночника после 2 лет лечения такой интравагинальной дозой E_2 (Salminen, Saaf et al., 2007).

Как упоминалось выше, существует озабоченность в отношении стимуляторных действий вагинальных эстрогенов на эндометрий (N.A.M.S. 2007). После 12 недель лечения 32 женщин 25 мкг интравагинального E_2 (Вагифема), одна пациентка имела простую гиперплазию без атипии (Bachmann, Lobo et al., 2008). В 24-недельном исследовании, включающем в себя 80 женщин, был обнаружен один случай пролиферативного эндометрия (Rioux, Devlin et al., 2000), а в другом 52-недельном исследовании с 31 женщиной две имели пролиферативный эндометрий (Mettler and Olsen 1991).

В 12-недельном исследовании с вагинальным кремом Премарином в дозе 2 г, три раза в неделю, 21% женщин испытывали кровотечение после теста с прогестагеном (Nachtigall 1995). Из них, 12% обнаруживали увеличение толщины эндометрия согласно эхографии. Применение дозы 0,3 мг конъюгированных эстрогенов, вводимой интравагинально, три раза в неделю, может индуцировать пролиферацию эндометрия, хотя и редко, так как пролиферацию эндометрия наблюдали только в одном из двадцати случаев (Nachtigall 1995).

Кольцо эстрадиола с пролонгированным высвобождением (EST-кольцо) индуцировало пролиферацию эндометрия, сходную с вызываемой 0,625 мг крема Премарина (Ayton, Darling et al., 1996), но меньшую, чем 1,25 мг крема Премарина (Nachtigall 1995). Фактически было показано, что как вагинальное кольцо (EST-кольцо), так и крем с конъюгированными эстрогенами (крем Premarin) индуцируют пролиферацию эндометрия (Nachtigall 1995; Ayton, Darling et al., 1996). Два случая умеренной пролиферации или гиперплазии эндометрия в эндометриальном полипе были обнаружены с кольцом E_2 (Nachtigall 1995), тогда как два случая гиперплазии (один простой и один сложный, без атипии) были обнаружены с кремом конъюгированных эстрогенов в испытании крема конъюгированных эстрогенов в сравнении с таблеткой E_2 (Rioux, Devlin et al., 2000). Вагинальная таблетка E_2 была ассоциирована с эндометриальной гиперплазией, подобно вагинальной таблетке эстрадиола (Dugal, Hesla et al., 2000; Manonai, Theppisai et al., 2001), но в меньшей степени, чем крем конъюгированных эстрадиолов (Manonai, Theppisai et al., 2001).

Хотя уровни эстрогена в сыворотке увеличиваются до более низкой степени после локального интравагинального применения в сравнении с пероральной или подкожной HRT или ERT, риск рака молочной железы остается проблемой, и безопасность интравагинальных эстрогенов является сомнительной (Suckling, Lethaby et al., 2006; N.A.M.S. 2007). Действительно, хотя увеличение сывороточных эстрогенов является более низким после интравагинального способа введения в сравнении с пероральным или чрескожным способом введения, оно значимо повышается выше нормальных постменопаузальных уровней для всех интравагинальных препаратов эстрогенов (Ponzone, Biglia et al., 2005).

Кроме увеличенного риска рака молочной железы, ассоциированного с введением эстрогенов, важно помнить о том, что истинное гормональное различие между постменопаузальными женщинами, которые не страдают от вагинальной атрофии (оцениваемой при 25% постменопаузальной популяции), и остальными 75% постменопаузальных женщин, которые страдают от вагинальной атрофии (Wines and Willsteed 2001; N.A.M.S. 2007), не связано с секрецией эстрогенов в системный кровоток, так как секреция эстрогенов яичниками прекращается во всех женщинах во время менопаузы (климакса). Вследствие этого, дефицит секреции эстрогенов не является достоверным объяснением наличия симптомов вагинальной атрофии в большинстве постменопаузальных женщин.

Однако образование половых стероидных гормонов не останавливается с прекращением функции яичников в менопаузе. Недавний прогресс в понимании эндокринной физиологии в женщинах показывает, что после менопаузы, ДНЕА, секретлируемый надпочечниками, является единственным источником половых стероидных гормонов, производимых исключительно в тканях-мишенях (Labrie 1991). В отличие от эстрогенов яичникового происхождения, которые секретируются в общий кровоток, где они могут быть измерены, ДНЕА является неактивным предшественником, который превращается в периферических тканях при различных скоростях в соответствии с уровнем экспрессии стероидогенных ферментов в каждой ткани. Этот процесс интракринологии делает возможным локальное внутритканное образование активных половых стероидных гормонов без существенного высвобождения этих активных стероидов в кровоток (Labrie, Dupont et al., 1985; Labrie, Belanger et al., 1988; Labrie 1991; Labrie, Luu-The et al., 2005).

Однако секреция DHEA, уменьшается с возрастом, причем 60% уменьшение наблюдается уже к моменту менопаузы (Labrie, Luu-The et al., 2003; Labrie, Belanger et al., 2005; Labrie, Luu-The et al., 2005; Labrie, Belanger et al., 2006; Labrie, Luu-The et al., 2006; Labrie 2007). Единственным различием между симптоматическими и асимптоматическими женщинами является количество DHEA, секретируемое надпочечниками, или чувствительность вагинальной ткани к DHEA. Это различие чувствительности различных женщин, связано, по-видимому, до неизвестной степени, с уровнем активности ферментативного аппарата, специфического для каждого типа ткани, в каждой ткани (Labrie 1991; Labrie, Belanger et al., 2005). С этим пониманием ясно, что именно DHEA, а не эстрогены является физиологической гормональной заместительной терапией для постменопаузальных женщин.

Как хорошо продемонстрировано в предыдущих исследованиях авторов этого изобретения (Labrie 1991; Labrie, Luu-The et al., 2003; Labrie, Luu-The et al., 2005; Labrie, Belanger et al., 2007), дополнение физиологическими количествами экзогенного DHEA делает возможным биосинтез андрогенов и/или эстрогенов только в подходящих тканях-мишенях, которые содержат требуемые стероидогенные ферменты интракринологии (Labrie, Luu-The et al., 2005). Активные андрогены и эстрогены, синтезированные локально из DHEA в периферических тканях-мишенях, проявляют их действие в тех же самых клетках, в которых происходит их образование. Наиболее важно, что имеет место очень небольшая утечка этих активных половых стероидных гормонов в кровотоки, что объясняет заметные полезные эффекты, наблюдаемые в вагине, без значимого изменения в циркулирующих эстрогенах или андрогенах (Labrie, Cusan et al., 2008). Этот локальный биосинтез, действие и инактивация эстрогенов и андрогенов в тканях-мишенях элиминирует подвергание других тканей действию избытка половых стероидов и, следовательно, элиминирует увеличенные риски нежелательных побочных действий от повышенного воздействия эстрогенов, в том числе рака молочной железы, рака яичников и рака матки (Gambrell, Massey et al., 1980; Persson, Adami et al., 1989; Steinberg, Thacker et al., 1991; Voigt, Weiss et al., 1991; Sillero-Arenas, Delgado-Rodriguez et al., 1992; Colditz, Egn et al., 1993; Jick, Walker et al., 1993; Colditz, Hankinson et al., 1995; Grady, Gebretsadik et al., 1995; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 1997; Garg, Kerklikowske et al., 1998; Coughlin, Giustozzi et al., 2000; Hulley 2002; Lacey, Mink et al., 2002; Riman, Dickman et al., 2002; Rodriguez, Patel et al., 2002; Rossouw, Anderson et al., 2002; Beral 2003; Chlebowski, Hendrix et al., 2003; Holmberg and Anderson 2004; Beral, Bull et al., 2005; Lyytinen, Pukkala et al., 2006; Corrao, Zambon et al., 2008; Holmberg, Iversen et al., 2008; Li, Plummer et al., 2008).

Изменение pH признается теперь валидным (достоверным) параметром, который отражает полезное действие терапии вагинальной атрофии. После 12 недель интравагинального лечения 25 мкг E₂, процент пациентов, имеющих pH менее 5,0, был равен 51% в сравнении с 21% в группе плацебо (Bachmann, Lobo et al., 2008). Однако при фоне 11,2 и 13% женщин имели pH ниже 5,0 в этих двух соответствующих группах. В клиническом исследовании ERC-210 (пример 3), ни один пациент не имел pH ниже 5,0 в начале терапии и 12%, 36%, 46% и 48% имели величины pH ниже 5,0 при 12 неделях в группах 0, 0,25, 0,5 и 1,0% DHEA, соответственно.

В клиническом исследовании ERC-210 (пример 3), это действие DHEA на созревание вагинальных эпителиальных клеток было особенно быстрым: с влажной овулой 0,5% DHEA, 79% максимального действия на парабазальные клетки наблюдали уже при 2 неделях, тогда как 48% максимального стимуляторного действия проявлялись на поверхностных клетках при том же самом временном интервале. С другой стороны, 85% максимальное стимуляторное действие 0,5% DHEA на процент поверхностных клеток достигалось при 4 неделях. Подобным образом, 63% максимального действия 0,5% DHEA на наиболее беспокоящий симптом наблюдали при 2 неделях и 87% достигали при 4 неделях. Кроме того, только 17,8% женщин сообщали об отсутствии изменений в их наиболее беспокоящем симптоме при 12 неделях в группе 0,5% DHEA в сравнении с 48,8% в группе плацебо.

Действие DHEA на парабазальных клетках является быстрым, так как % парабазальных клеток уменьшался до менее 20% при одном месяце с тремя используемыми дозами DHEA. Действие на % поверхностных клеток является также очень быстрым с 100% эффектом, наблюдаемым при 2 неделях с высокой (1%) дозой DHEA. В исследовании с вагинальным кремом или таблеткой эстрогена приблизительно 50% эффекта, измеренного при 12 неделях, наблюдали при 2 неделях (Rioux, Devlin et al., 2000). Такие результаты показывают, что скорость эффекта DHEA не является худшей, а является, возможно, лучшей относительно эффекта вагинальных препаратов E₂ и конъюгированных эстрогенов.

В одном исследовании действия пероральных эстрогенов в 71 постклимактерической женщине, суточное введение 0,3 мг пероральных синтетических конъюгированных эстрогенов уменьшало парабазальные клетки от 23 до 2,3%, в то время как поверхностные клетки увеличивались в количестве от 2,1 до 15,9%. (Marx, Schade et al., 2004). В одном исследовании, сравнивающем дозы 0,3 и 0,625 мг конъюгированных лошадиных эстрогенов (Utian, Shoupe et al., 2001), доза 0,625 мг показала большее действие на % поверхностных клеток.

В одном недавнем исследовании, вагинальная величина зрелости (VMV) увеличивалась с 27,45 при фоне до 56,85 (p<0,0001) в обработанной эстрогеном группе (Simon, Reape et al., 2007). Процент поверхностных клеток увеличивался на 17,15 от фона, тогда как процент парабазальных клеток уменьшался на 41,66% в обработанной эстрогеном группе. В том же самом исследовании, вагинальный pH уменьшался

от 6,64 при фоне до 5,05 (уменьшение 1,69 или 24%) в группе эстрогена). Тяжесть наиболее беспокоящих симптомов уменьшалась от 2,58 до 1,04 (-1,54) в группе эстрогена в сравнении с уменьшением от 2,59 до 1,84 (-0,75) в группе плацебо. Такие результаты, наблюдаемые с эстрогенами, сравнимы с уменьшением 1,56 тяжести наиболее беспокоящих симптомов при 12 неделях в группе 0,5% DHEA и уменьшением 0,67 в группе плацебо, наблюдаемой в клиническом исследовании ERC-210 (пример 3).

При неделе 12, 11% субъектов группы EST-кольца и 24% субъектов группы Вагифема имели стойкий атрофический эпителий. При неделе 48, соответствующие величины были равны 8 и 14% (Weisberg, Ayton et al., 2005). При 48 неделях лечения с использованием Вагифема или EST-кольца, сухость вагины все еще присутствовала в 33% женщин (Weisberg, Ayton et al., 2005). С другой стороны, зуд вульвы, присутствовал в 15 и 20% женщин после лечения с использованием EST-кольца и Вагифема, соответственно, в то время как 33 и 28% женщин все еще имели диспареунию после лечения с использованием EST-кольца и Вагифема, соответственно. Кровотечение после теста прогестагена было 7% в группе Вагифема и 0% в группе EST-кольца.

После 3 месяцев ежедневного введения 0,625 мг Премарина перорально или интравагинально (в виде крема), наблюдали 70,6 и 75% улучшения диспареунии (Long, Liu et al., 2006). В этом исследовании был сделан вывод, что 1 г 0,625 мг Премарина был минимальной дозой для лечения половой дисфункции.

В женщинах, которые получали 25 мкг E₂ интравагинально, диспареуния сохранялась в 12,4% случаев после 12 месяцев лечения (Simunic, Banovic et al., 2003). Степень успеха терапии локальными таблетками E₂ 84,5%, согласно оцениванию пациентами, и 86,1%, согласно оцениванию врачами (Simunic, Banovic et al., 2003). Bachman et al., 1992 (Bachmann, Notelovitz et al., 1992) сообщали, что 40-50% женщин, получающих пероральную заместительную терапию с использованием эстрогена, имели постоянные жалобы на сухость вагины.

Как сообщалось ранее, после 12 месяцев лечения DHEA (Labrie, Diamond et al., 1997), клиническое исследование ERC-210 (пример 3) не обнаруживает действия на гистологию эндометрия после 3 месяцев интравагинального введения предшественника гормона DHEA, как показано гистопатологическим обследованием эндометриальных биопсий, полученных до и после 12 недель лечения. Эти открытия находятся в согласии с отсутствием ароматазной активности в эндометрии человека (Baxendale, Reed et al., 1981; Bulun, Lin et al., 2005). Эти открытия в сильной степени поддерживаются широко признаваемым клиническим наблюдением, что эндометриальная атрофия является характеристикой постменопаузы, несмотря на непрерывную секрецию DHEA на протяжении жизни (Labrie, Luu-The et al., 2005; Labrie, Belanger et al., 2006). Отсутствие в эндометрии человека стероидогенных ферментов, необходимых для превращения DHEA в эстрогены, находится в согласии с физиологической ролью эндометрия, который является активным исключительно во время репродуктивных лет, когда его функция по существу контролируется гормонами, происходящими из яичников и плаценты. После наступления менопаузы нет физиологической роли эндометрия, которая могла бы корректировать любое продолжающееся действие эстрогенов после прекращения секреции эстрогенов яичниками. Таким образом, ферменты, необходимые для синтеза эстрогенов из DHEA, не экспрессируются в эндометрии, который является тканью, полностью зависимой от эстрогенов, происходящих из яичников.

Давно было известно, что эстрогены, вводимые отдельно, стимулируют пролиферацию эндометрия (Smith, Prentice et al., 1975), тогда как прогестины, вводимые в комбинации с эстрогенами, ингибируют стимулирующее действие эстрогенов (Feeley and Wells 2001). Поскольку рецепторы андрогенов экспрессируются в эндометрии и строме человека (Mertens, Heineman et al., 1996), интересно упомянуть, что клиническое исследование, которое исследовало действие андрогенов, не показало действия на эндометрий относительно высокой дозы тестостерона в постменопаузальных женщинах (ундеканоата тестостерона, 40 мг каждый второй день) (Zang, Sahlin et al., 2007). В женщинах, которые получали валерат эстрадиола (2 мг/день), Кi-мечение увеличивалось на 50% при 3 месяцах лечения, тогда как одновременное введение тестостерона уменьшало пролиферацию до 28%. Кi67-мечение увеличивалось только в двух группах, получающих эстроген, но уменьшалось добавлением тестостерона в строму. Хотя и не было стимулирующего действия на пролиферацию эндометрия в женщинах, тестостерон, по-видимому, проявлял некоторое антиэстрогенное действие в эндометрии.

Хотя руководство FDA поощряет спонсоров в отношении разработки самых низких доз и воздействий как для эстрогенов, так и для прогестинов, по мнению авторов этого изобретения, следует признать, что, хотя эстрогены являются эффективными в коррекции симптомов вагинальной атрофии и вазомоторных симптомов, системные эстрогены не являются физиологическими гормонами, которые позволяют 25% постменопаузальным женщинам избежать умеренных - тяжелых симптомов вагинальной атрофии. Эти женщины остаются относительно бессимптомными на протяжении всех их менопаузальных лет, поскольку единственным источником половых стероидных гормонов в постменопаузальных женщинах, как симптоматических, так и асимптоматических, является локальный биосинтез эстрогена и андрогена из DHEA надпочечников, при помощи механизмов интракринологии. Заместительная терапия с использованием DHEA является единственным физиологическим подходом, который позволяет обеспечивать женщин, страдающих от постменопаузальных симптомов, недостающим количеством DHEA, ответст-

венным за их симптомы. С использованием этого подхода, называемого заместительной терапией с использованием предшественника гормона (HPRT), вагинальная атрофия и вазомоторные симптомы должны корректироваться с риском, не превышающим риск таких же постменопаузальных женщин, которые не имеют симптомов вагинальной атрофии, вследствие более высокого подвергания действию DHEA и половых стероидных гормонов, производимых внутриклеточно процессом интракринологии.

Предшественники половых стероидных гормонов, вводимые в соответствии с этим изобретением, предпочтительно вводят в диапазоне доз (1) 0,5-100 мг в день (предпочтительно 3-50 мг в день и наиболее предпочтительно 3-13 мг в день), при интравагинальном введении; (2) в диапазоне доз 15-200 мг в день (предпочтительно 30-100 мг в день) при введении на кожу; (3) в диапазоне доз 1-200 мг в день (предпочтительно 25-100 мг в день), например, 75 мг в день, при пероральном введении; или (4) в диапазоне доз 1,0-25 мг в день (предпочтительно 3,25-20 мг в день) при парентеральном введении (т.е. внутримышечном или подкожном).

В фармацевтической композиции для вагинального введения, DHEA или другой предшественник предпочтительно присутствует в концентрации 0,1-10 мас.% относительно общей массы этой композиции, более предпочтительно 0,2-3,0%, в частности 0,25-2,0%. Например, 1,3 миллилитра (мл) вагинального суппозитория, имеющего 0,5 мас.% DHEA (относительно массы всей композиции), вводимые один раз в день, обеспечивают желательные 6,5 мг/день DHEA. Могут быть использованы большие или меньшие суппозитории, так же как и отличающиеся концентрации, при сохранении дозы в этом желаемом диапазоне.

В фармацевтической композиции для введения на кожу, DHEA или другой предшественник предпочтительно присутствует в концентрации 0,1-10 мас.% относительно общей массы этой композиции, более предпочтительно 0,2-2,0%, в частности, 0,3-1,5%.

В фармацевтической композиции для перорального введения, DHEA или другой предшественник предпочтительно присутствует в концентрации 5-98 мас.% относительно общей массы этой композиции, более предпочтительно 10-50%, в частности 15-40%.

В фармацевтической композиции для парентерального введения (т.е. внутримышечного или подкожного), DHEA или другой предшественник предпочтительно присутствует в концентрации 0,2-25 мг/мл, более предпочтительно 0,65-15 мг/мл, в частности 2-10 мг/мл.

Пример эффективности изобретения

Пример 1.

Клиническое исследование ERC-213.

Биодоступность DHEA после введения вагинальных суппозитория в постменопаузальных женщинах с вагинальной атрофией в рандомизированном, плацебоконтролируемом исследовании фазы I.

Фармакокинетика и локальное действие ежедневного введения вагинальных суппозитория DHEA в течение одной недели.

Первичной целью этого изобретения было оценивание системной биодоступности DHEA и его метаболитов после ежедневного интравагинального введения суппозитория при четырех различных концентрациях DHEA. Это исследование было рандомизированным, плацебоконтролируемым и двойным слепым исследованием с 10 субъектами на одну ветвь исследования. Таким образом, сорок постменопаузальных женщин рандомизировали для получения суточной дозы одного суппозитория следующих концентраций DHEA: 0,0, 0,5% (6,5 мг DHEA/суппозиторий), 1,0% (13 мг DHEA/суппозиторий) или 1,8% (23,4 мг DHEA/суппозиторий).

Индекс зрелости, а также вагинальный pH измеряли при предобработке, а также после 7 дней лечения для получения указания на локальное действие DHEA во время короткого периода времени.

Как иллюстрируется на фиг. 1B, в табл. 1 и 2, ежедневное интравагинальное введение 1,3 мл суппозитория, содержащего 0,5, 1,0 и 1,8% DHEA, приводило к прогрессирующему увеличению сывороточного DHEA с величинами $AUC_{0-24ч}$ $24,8 \pm 4,8$ нг·ч/мл, $56,2 \pm 8,9$ нг·ч/мл ($p < 0,05$), $76,2 \pm 10,3$ нг·ч/мл ($p < 0,01$) и $114,3 \pm 9,97$ нг·ч/мл ($p < 0,01$), соответственно. Таким образом, имелись увеличения 127, 207 и 361% над контролем при дозах 0,5, 1,0 и 1,8% DHEA, соответственно. Как наблюдалось для всех других стероидов, сходные величины $AUC_{0-24ч}$ в дни 1 и 7.

Действительно, средняя величина $4,76 \pm 0,42$ нг/мл DHEA после лечения самой высокой дозой (табл. 2) является сходной с величиной $4,47 \pm 2,19$ нг/мл, обнаруженной в сорока семи (47) 30-35-летних предменопаузальных здоровых женщинах (Labrie, Belanger et al., 2006). Этот сывороточный DHEA после любой из использованных доз DHEA остается в пределах границ здоровых предменопаузальных женщин, как хорошо иллюстрировано на фиг. 7A.

Как наблюдалось ранее после перорального или подкожного введения DHEA (Labrie, Belanger et al., 2007), сывороточный 5-диол обнаруживает картину, почти совмещаемую с картиной DHEA, хотя наблюдаются гораздо более низкие концентрации. Действительно, величина $AUC_{0-24ч}$ увеличивается от $5,60 \pm 0,60$ нг·ч/мл в группе плацебо в день 7 до $9,83 \pm 1,14$ ($p < 0,05$), $13,8 \pm 1,87$ ($p < 0,01$) и $21,0 \pm 1,66$ ($p < 0,01$) при дозах 0,5, 1,0 и 1,8% DHEA, соответственно (1D, табл. 1). Такие изменения соответствуют 75, 147 и 276% увеличениям над контролем. Только доза 1,8% DHEA вызывает увеличения сывороточного 5-

диола, превышающие величины, обнаруженные в здоровых предменопаузальных женщинах (фиг. 7B) во время 24 ч после ежедневного интравагинального введения DHEA в день 7.

Величина $AUC_{0-24ч}$ сывороточного тестостерона (Тесто) не обнаруживала значимого изменения при дозе 0,5% ($2,79 \pm 0,30$ нг·ч/мл против $2,58 \pm 0,33$ нг·ч/мл в группе плацебо) (фиг. 2B). При дозах 1,0% и 1,8%, были обнаружены величины $AUC_{0-24ч}$ $4,54 \pm 0,91$ нг·ч/мл ($p < 0,05$) и $5,97 \pm 0,69$ нг·ч/мл ($p < 0,01$) (табл. 1). Эти величины соответствуют средним сывороточным уровням Тесто $0,11 \pm 0,01$ (N.S.), $0,12 \pm 0,01$ (N.S.), $0,19 \pm 0,04$ ($p < 0,05$) и $0,25 \pm 0,03$ ($p < 0,01$) нг/мл, соответственно. Даже при наивысшей использованной дозе 1,8% DHEA, уровни сывороточного Тесто оставались в пределах нормального диапазона предменопаузальных женщин, измеренного при $0,18 \pm 0,07$ нг/мл (0,06-0,31, 5-й - 95-й процентиля) (Labrie, Belanger et al., 2006) (фиг. 7E). С другой стороны, доза 1,0% ($0,18 \pm 0,07$ нг/мл) соответствует точно величинам, обнаруженным в здоровых предменопаузальных женщинах, а именно $0,19 \pm 0,4$ (фиг. 7E).

На фиг. 2C и D, сывороточный DHT увеличивался от величины $AUC_{0-24ч}$ $0,58 \pm 0,07$ нг·ч/мл в группе плацебо в день 7 до $0,93 \pm 0,11$ (N.S.), $1,31 \pm 0,26$ ($p < 0,05$) и $1,93 \pm 0,23$ ($p < 0,01$) нг·ч/мл в группах 0,5, 1,0 и 1,8% DHEA, соответственно (табл. 2). Эти величины соответствуют средним сывороточным уровням DHT $0,02 \pm 0,01$, $0,04 \pm 0,01$, $0,05 \pm 0,01$ и $0,08 \pm 0,01$ нг/мл (табл. 2), достигая, следовательно, при наивысшей дозе DHEA, нормальных уровней сывороточного DHT $0,07 \pm 0,03$ нг/мл, наблюдаемых в предменопаузальных женщинах (Labrie, Belanger et al., 2006) (фиг. 7F).

Средние уровни сывороточного E_1 измеряли при $12,6 \pm 1,41$ нг/мл в группе плацебо в день 7 (табл. 2), в то время как при дозе 0,5% DHEA не было значимого изменения ($15,4 \pm 2,04$ нг/мл). Увеличение до $24,1 \pm 3,54$ нг/мл ($p < 0,01$) и $25,0 \pm 2,85$ нг/мл ($p < 0,01$) наблюдали при дозах 1,0 и 1,5% DHEA, соответственно. Соответствующие величины $AUC_{0-24ч}$ показаны на фиг. 3B и указаны в табл. 1.

Средние уровни сывороточного E_2 измеряли при $2,77 \pm 0,29$ пг/мл и $4,04 \pm 0,69$ пг/мл (N.S.) в группах плацебо и 0,5% DHEA, соответственно (табл. 2). Средние сывороточные концентрации E_2 $6,01 \pm 1,31$ пг/мл ($p < 0,05$) и $5,68 \pm 0,84$ пг/мл ($p < 0,05$) обнаруживали в день 7 в женщинах, которые получали дозы 1,0 и 1,8% DHEA, с абсолютными увеличениями 3,18 и 2,85 пг/мл над плацебо, соответственно. Сравнимые открытия наблюдали для средних сывороточных уровней E_1 -S со средними сывороточными уровнями $0,12 \pm 0,02$ и $0,13$ нг/мл (N.S.) в группе плацебо и группе 0,5% DHEA, соответственно (табл. 2). Величины $0,18 \pm 0,03$ и $0,25 \pm 0,25$ нг/мл измеряли в группах 1,0 и 1,8% DHEA, соответственно. Только группа 1,8% DHEA обнаруживает статистическое различие ($p < 0,01$) с группой плацебо.

Как можно видеть в 4B и D, сравнимую картину наблюдали как для E_1 -S, так и для DHEA-S. Величину $AUC_{0-24ч}$ сывороточного DHEA-S измеряли при $8,35 \pm 2,22$ нг·ч/мл в группе плацебо и $13,3 \pm 3,16$ нг·ч/мл в группе 0,5% DHEA group (N.S.). С двумя более высокими дозами DHEA, величины $AUC_{0-24ч}$ измеряли при $16,5 \pm 2,71$ нг·ч/мл (N.S.) и $19,3 \pm 3,59$ нг·ч/мл ($p < 0,05$), соответственно (фиг. 4D, табл. 1). Эти величины DHEA-S при всех дозах DHEA остаются ниже уровней сывороточного DHEA-S, наблюдаемых в предменопаузальных женщинах, которые обнаруживают среднее $1,27 \pm 0,62$ нг·ч/мл (7C).

Как иллюстрировано на фиг. 5B, величины $AUC_{0-24ч}$ сывороточного 4-диола после введения DHEA в день 7 измеряли при $6,34 \pm 0,80$ и $8,71 \pm 0,84$ нг·ч/мл (N.S.) в группе плацебо и группе 0,5% DHEA, соответственно. При этих двух более высоких дозах DHEA, величины $AUC_{0-24ч}$ 4-диола слегка увеличивались до $11,1 \pm 1,51$ ($p < 0,01$) и $11,9 \pm 0,81$ ($p < 0,01$) нг·ч/мл, соответственно. Как можно видеть в 7D и табл. 2, все эти величины сывороточного 4-диола оставались гораздо более низкими, чем средние концентрации сывороточного 4-диола, наблюдаемые в здоровых предменопаузальных женщинах. Действительно, наивысшая доза DHEA приводила к средним концентрациям сывороточного 4-диола $0,50 \pm 0,03$ нг/мл, тогда как средняя величина в 30-35-летних имеющих менструальный цикл женщинах равна $0,96 \pm 0,35$ нг/мл (Labrie, Belanger et al., 2006) (Appendix T), достигая, следовательно, только 50% уровней сывороточного 4-диола, наблюдаемых в предменопаузальных женщинах.

С учетом решающей роли измерений сывороточных уровней ADT-G, 3α -диол-3G и 3α -диол-17G (Labrie, Belanger et al., 2006) интересно отметить, что в 5D и табл. 2 сывороточные уровни ADT-G увеличивались от средней величины $6,97 \pm 1,20$ нг/мл в группе плацебо до $19,2 \pm 3,99$ нг·ч/мл в группе 0,5% DHEA ($p < 0,01$). Величины $19,7 \pm 2,48$ и $25,7 \pm 2,88$ нг·ч/мл были измерены в группах 1,0 и 1,8% DHEA, соответственно ($p < 0,01$ против групп плацебо для обеих DHEA-обработанных групп). Сходные изменения можно видеть для минорных метаболитов андрогена 3α -диол-3G и 3α -диол-17G (6B, 6D, 8B и 8C, табл. 1 и табл. 2). Важно указать на то, что, как показано на фиг. 8, даже при наивысшей использованной дозе DHEA средние сывороточные уровни ADT-G, 3α -диол-3G и 3α -диол-17G оставались 36, 11 и 6% ниже средних сывороточных уровней, обнаруженных в предменопаузальных женщинах.

Как показано в табл. 2, сумма глюкуронидов метаболитов андрогена, измеренная на протяжении 24-часового периода в день 7 введения 1,3 мл суппозитория, содержащего 1,8% DHEA (23,4 мг DHEA), равна только 28,2 нг/мл, тогда как средняя сывороточная концентрация того же самого метаболита в 30-35-летних предменопаузальных женщинах равна 42,8 нг/мл (Labrie, Belanger et al., 2006) (приложение 2). Таким образом, наивысшая использованная доза DHEA приводит только к 65,7% величины, соответствующей общим метаболитам андрогенов, обнаруживаемой в здоровых имеющих менструальный цикл

женщинах. С другой стороны, дозы 0,5 и 1,0% DHEA приводят к суммам метаболитов андрогенов 21,02 и 21,53 нг/мл, соответственно, что соответствует, следовательно, только 49,0 и 50,2% величин, наблюдаемых в предменопаузальных женщинах (фиг. 9). Авторы этого изобретения обнаружили ранее, что ежедневное пероральное введение 100 мг DHEA приводит к 74% уровней, обнаруживаемых в предменопаузальных женщинах (Labrie, Belanger et al., 2007).

Авторы этого изобретения наблюдали, что после перорального или подкожного введения DHEA, изменения в сывороточном DHEA являются приблизительно на 100% завышенной оценкой изменений в образовании стероидов, отражаемых изменениями в сывороточных ADT-G, 3 α -диол-3G и 3 α -диол-17G (Labrie, Belanger et al., 2007). Как можно видеть на фиг. 9, средние уровни сывороточного DHEA менялись от 23% величины, наблюдаемой в предменопаузальных женщинах группы плацебо, до 52, 71 и 106% в женщинах, которые получали дозы 0,5, 1,0 и 1,8% DHEA, соответственно. Данные фиг. 9 показывают, что изменения в сывороточном DHEA после интравагинального введения DHEA, также являются завышенной оценкой изменений в образовании андрогенов и, возможно, даже более в образовании эстрогенов, как иллюстрируется даже еще более низкими количествами сывороточного E₁-S (табл. 1). Действительно, при дозе 1,0%, сывороточные метаболиты андрогенов увеличивались на 31,6% величины, обнаруживаемой в предменопаузальных женщинах, тогда как сывороточный DHEA увеличивался на 49,1% (превышение на 55%). При наивысшей дозе DHEA сывороточные метаболиты андрогенов увеличивались на 47,1%, тогда как сывороточный DHEA увеличивался на 83,5 (превышение 77%).

Таблица 1. Величины площадей под кривой (AUC_{0-24ч}) DHEA и одиннадцати его метаболитов в дни 1 и 7 ежедневного введения интравагинальных суппозиторий 40-75-летним постменопаузальным женщинам с вагинальной атрофией

Группа	Величина	DHEA		5-DIOL		TESTO		DHT		E1		E2	
		День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл
Плацебо	Среднее	24,47	24,82	5,55	5,60	2,71 ^a	2,58 ^a	0,61	0,58	305,58	301,92	69,51	66,49
	SEM	4,80	4,77	0,59	0,60	0,34	0,33	0,08	0,07	34,56	33,77	7,63	6,90
DHEA 0.5%	Среднее	65,49	56,17	10,91	9,83	2,79	2,79	0,91	0,93	336,52	369,69	87,79	96,93
	SEM	7,80	8,94	1,03	1,14	0,29	0,30	0,10	0,11	37,96	48,86	11,34	16,46
DHEA 1.0%	Среднее	74,82	76,22	12,09	13,84	3,79	4,54	1,11	1,31	418,08	578,59	101,57	144,34
	SEM	6,71	10,28	1,66	1,87	0,70	0,91	0,23	0,26	70,91	84,90	22,97	31,47
DHEA 1.8%	Среднее	123,52	114,30	18,98	21,04	5,13	5,97	1,62	1,93	433,74	600,93	89,76	136,28
	SEM	9,43	9,96	1,05	1,66	0,72	0,69	0,19	0,23	37,68	68,35	11,65	20,27
Группа	E1-S		DHEA-S		4-DIONE		ADT-G		3 α -DIOL-3G		3 α -DIOL-17G		
	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 мкг.ч/мл	День 7 мкг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	
Плацебо	3,15	2,93	8,71	8,35	6,23	6,34	176,53	167,39	12,00	12,00	12,53	12,20	
	0,62	0,47	2,41	2,22	0,71	0,80	30,86	28,87	0,00	0,00	0,53	0,20	
DHEA 0.5%	3,19	3,24	13,59	13,29	9,03	8,71	474,10	461,15	16,01	16,73	24,68	26,74	
	0,60	0,63	3,42	3,16	0,98	0,84	126,99	95,77	2,02	1,97	4,70	5,02	
DHEA 1.0%	3,14	4,37	14,42	16,49	10,28	11,06	417,73	471,54	17,12	20,14	20,88	24,94	
	0,44	0,60	3,07	2,71	1,35	1,51	66,09	59,54	2,28	3,26	4,42	4,75	
DHEA 1.8%	4,23	5,93	14,99	19,33	10,61	11,94	510,77	617,73	20,36	26,02	22,00	32,23	
	0,76	1,11	2,62	3,59	0,63	0,81	52,78	69,01	2,31	3,38	2,68	4,35	

a: данные одного пациента исключены.

Таблица 2. Средние уровни сывороточных стероидов DHEA и одиннадцати его метаболитов в дни 1 и 7 ежедневного введения интравагинальных суппозиторий 40-75-летним постменопаузальным женщинам с вагинальной атрофией

Группа	Величина	DHEA		5-DIOL		TESTO		DHT		E1		E2	
		День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл
Плацебо	Среднее	1,02	1,03	0,23	0,23	0,11 ^a	0,11	0,026	0,024	12,73	12,58	2,90	2,77
	SEM	0,20	0,20	0,02	0,02	0,01	0,01	0,003	0,003	1,44	1,41	0,32	0,29
DHEA 0.5%	Среднее	2,73	2,34	0,45	0,41	0,12	0,12	0,038	0,039	14,02	15,40	3,66	4,04
	SEM	0,33	0,37	0,04	0,05	0,01	0,01	0,004	0,004	1,58	2,04	0,47	0,69
DHEA 1.0%	Среднее	3,12	3,18	0,50	0,58	0,16	0,19	0,046	0,055	17,42	24,11	4,23	6,01
	SEM	0,28	0,43	0,07	0,08	0,03	0,04	0,010	0,011	2,95	3,54	0,96	1,31
DHEA 1.8%	Среднее	5,15	4,76	0,79	0,88	0,21	0,25	0,068	0,081	18,07	25,04	3,74	5,68
	SEM	0,39	0,42	0,04	0,07	0,03	0,03	0,008	0,010	1,57	2,85	0,49	0,84

30-35-летние предменопаузальные женщины (n=7)	Среднее	4,47	0,49	0,18	0,07	53,96	82,05						
	SD	2,19	0,20	0,07	0,03	23,28	42,19						
	Медиана	4,14	0,44	0,17	0,07	49,47	71,38						
	(мин.-макс)	1,53-9,14 (1,41-10,37)	0,25-0,84 (0,25-0,96)	0,06-0,31 (0,09-0,32)	0,03-0,14 (0,03-0,17)	23,74-87,46 (79,23-123,50)	22,0-159,97 (17,71-181,14)						
Группа	Величина	E1-S		DHEA-S		4-DIONE		ADT-G		3 α -DIOL-3G		3 α -DIOL-17G	
		День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 мкг.ч/мл	День 7 мкг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл	День 1 нг.ч/мл	День 7 пг.ч/мл
Плацебо	Среднее	0,13	0,12	0,36	0,35	0,26	0,26	7,66	6,97	0,50	0,50	0,52	0,51
	SEM	0,03	0,02	0,10	0,09	0,03	0,03	1,29	1,20	0,00	0,00	0,02	0,01
DHEA 0.5%	Среднее	0,13	0,13	0,57	0,55	0,38	0,36	19,75	19,21	0,67	0,70	1,03	1,11
	SEM	0,02	0,03	0,14	0,13	0,04	0,03	5,29	3,99	0,08	0,08	0,20	0,21
DHEA 1.0%	Среднее	0,13	0,18	0,60	0,69	0,43	0,46	17,41	19,65	0,71	0,84	0,87	1,04
	SEM	0,02	0,03	0,13	0,11	0,06	0,06	2,76	2,48	0,10	0,14	0,18	0,20
DHEA 1.8%	Среднее	0,18	0,25	0,62	0,81	0,44	0,50	21,28	25,74	0,85	1,08	0,92	1,34
	SEM	0,03	0,05	0,11	0,15	0,03	0,03	2,20	2,80	0,10	0,14	0,11	0,18
30-35-летние предменопаузальные женщины (n=7)	Среднее	1,19	1,27	0,96	0,96	40,21	1,21	1,43					
	SD	0,93	0,62	0,35	0,35	29,31	0,83	0,93					
	Медиана	0,87	1,04	0,92	0,92	31,62	1,06	1,35					
	(мин.-макс)	0,31-3,50 (0,21-4,40)	0,56-2,65 (0,45-2,71)	0,45-1,64 (0,31-1,77)	0,45-1,64 (0,31-1,77)	12,17-118,2 (6,86-132,6)	0,25-7,78 (0,25-4,33)	0,25-2,56 (0,25-5,71)					

а: данные одного пациента исключены.

Эти величины получали делением величин AUC_{0-24ч}, измеренных в дни 1 и 7, на 24, с получением посредством этого средней сывороточной концентрации каждого стероида на протяжении 24-часового периода. Концентрации сывороточных стероидов, измеренные в 30-35-летних предменопаузальных женщинах добавляли в качестве ссылки. (Labrie, Belanger et al., 2006).

Однако следует упомянуть, что, как показано в табл. 3, наблюдали сильную тенденцию в отношении более низких величин перед лечением многих стероидов в группе плацебо. Это относится, в частности, к низким величинам в группе плацебо для DHEA, DHEA-S, 4-диона, Тесто (тестостерона), DHT, E₂, ADT-G и 3 α -диол-17G. Поскольку все средние величины сывороточных стероидов, наблюдаемые после введения доз 0,5 и 1,0% DHEA, остаются в пределах или явно ниже величин, обнаруживаемых в здоровых предменопаузальных женщинах, попытки коррекции этого явного отклонения не предпринимались. Интересно упомянуть, что средние 24-часовые сывороточные уровни всех стероидов, измеренные в день 7 ежедневного введения суппозитория с 0,5% DHEA, соответствуют почти точно величинам, измеренным в здоровых 55-65-летних женщинах, тогда как суппозиторий с 1,0% DHEA приводит к величинам в пределах диапазона, наблюдаемого в 55-65-летних здоровых женщинах (Labrie, Belanger et al., 2006).

Поскольку метаболиты андрогенов являются наиболее надежным критерием превращения экзогенного DHEA в активные андрогены, представленные результаты показывают, что даже самая высокая доза DHEA, использованная в данном изобретении, удовлетворяет требованиям FDA в отношении сывороточных уровней стероидов, которые остаются в пределах нормального диапазона, обнаруживаемого в здоровых предменопаузальных женщинах.

Таблица 3. Фоновые сывороточные уровни стероидов в дни 1 и 7 ежедневного введения интравагинальных увеличивающихся доз ДНЕА выражены в нг/мл, за исключением E₁ и E₂ (пг/мл) и ДНЕА-S (мкг/мл)

Стероид		Плацебо	ДНЕА 0.5%	ДНЕА 1.0%	ДНЕА 1.8%
ДНЕА	День 1	0,72 ± 0,14	1,09 ± 0,24	0,94 ± 0,19	0,99 ± 0,15
	День 7	0,69 ± 0,14	1,29 ± 0,26	1,43 ± 0,19	1,83 ± 0,13
5-диол	День 1	0,22 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,26 ± 0,05	0,25 ± 0,02
	День 7	0,22 ± 0,02	0,31 ± 0,05	0,36 ± 0,05	0,46 ± 0,04
ДНЕА-S	День 1	0,372 ± 0,102	0,543 ± 0,157	0,572 ± 0,144	0,447 ± 0,094
	День 7	0,368 ± 0,100	0,592 ± 0,160	0,717 ± 0,125	0,805 ± 0,143
4-дион	День 1	0,18 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,22 ± 0,03
	День 7	0,16 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,34 ± 0,06	0,38 ± 0,03
Testo	День 1	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,15 ± 0,03
	День 7	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,18 ± 0,03	0,23 ± 0,03
DHT	День 1	0,024 ± 0,003	0,026 ± 0,003	0,037 ± 0,010	0,029 ± 0,002
	День 7	0,023 ± 0,002	0,035 ± 0,004	0,047 ± 0,010	0,062 ± 0,006
E ₁	День 1	11,98 ± 1,65	11,83 ± 1,28	14,72 ± 2,79	13,59 ± 1,88
	День 7	11,71 ± 1,19	13,53 ± 1,66	22,15 ± 3,21	23,77 ± 3,35
E ₂	День 1	3,00 ± 0,44	3,13 ± 0,37	4,30 ± 1,38	3,42 ± 0,62
	День 7	2,75 ± 0,28	3,94 ± 0,65	5,98 ± 1,26	6,00 ± 1,10
E ₁ S	День 1	0,137 ± 0,024	0,133 ± 0,029	0,117 ± 0,016	0,164 ± 0,033
	День 7	0,143 ± 0,025	0,151 ± 0,034	0,203 ± 0,016	0,259 ± 0,049
ADT-G	День 1	7,42 ± 1,48	13,65 ± 3,71	11,49 ± 2,10	9,44 ± 1,23
	День 7	6,72 ± 1,17	17,02 ± 4,39	16,34 ± 2,30	19,26 ± 1,96
3а-диол-3G	День 1	0,50 ^a	0,61 ± 0,07	0,71 ± 0,14	0,58 ± 0,05
	День 7	0,50 ^a	0,75 ± 0,11	0,96 ± 0,25	0,96 ± 0,15
3а-диол-17G	День 1	0,50 ^a	0,84 ± 0,16	0,85 ± 0,22	0,65 ± 0,06
	День 7	0,50 ^a	0,95 ± 0,16	1,18 ± 0,30	1,27 ± 0,19

a: уровни стероидов находятся ниже предела количественного определения для всех субъектов (предел количественного определения=0,50 нг/мл).

После всего лишь одной недели ежедневного введения суппозиторий ДНЕА, индекс зрелости увеличился на 107% ($p < 0,01$), 75% ($p < 0,05$) и 150% ($p < 0,1$) в группах 0,5, 1,0 и 1,8% ДНЕА, соответственно (фиг. 10А). Изменений не наблюдали в группе плацебо между днем 1 и днем 7. С другой стороны, вагинальный pH уменьшался от $6,29 \pm 0,21$ до $5,75 \pm 0,27$ ($p < 0,05$), от $6,47 \pm 0,23$ до $5,76 \pm 0,22$ ($p < 0,01$) и от $6,53 \pm 0,25$ до $5,86 \pm 0,28$ ($p < 0,05$), соответственно, в группах 0,5, 1,0 и 1,8% ДНЕА (фиг. 10В). В группе плацебо не наблюдали изменения вагинального pH.

Пример 2.

Биодоступность и метаболизм перорального и подкожного дегидроэпиандростерона в постменопаузальных женщинах.

1. Введение.

Люди, вместе с другими приматами, являются уникальными среди видов животных в том отношении, что они имеют надпочечники, которые секретируют большие количества неактивных предшественников стероидов ДНЕА и, в частности, ДНЕА-S, которые превращаются в активные андрогены и/или эстрогены в периферических тканях (Labrie, 1991; Labrie, Belanger et al., 1995; Labrie, Luu-The et al., 1997; Labrie, Simard et al., 1996; Labrie, Luu-The et al., 2005; Labrie, Poulin et al., 2006 and Simpson 2000). Действительно, уровни ДНЕА-S в плазме во взрослых мужчинах и женщинах являются в 100-500 раз более высокими, чем уровни тестостерона, и в 1000-10000 раз более высокими, чем уровни эстрадиола, что обеспечивает большой запас субстрата для превращения в андрогены и/или эстрогены в периферических интракринных тканях, которые имеют ферментативный аппарат, необходимый для превращения ДНЕА в активные половые стероидные гормоны (Labrie 1991 и Labrie, Luu-The et al., 2005). Действительно, термин интракринология был впервые придуман в 1988 году (Labrie, Belanger et al., 1988) для описания синтеза активных стероидов, производимых в тех же самых клетках, в которых они проявляют их действие, с отсутствием высвобождения или с минимальным высвобождением во внеклеточное пространство и общий кровоток перед их инактивацией (Labrie, 1991).

Заметное уменьшение образования ДНЕА-S надпочечниками во время старения (Belanger et al., 1994; Vermeulen and Verdonck, 1976; and Migeon et al., 1957) приводит к разительному снижению образования андрогенов и эстрогенов в периферических тканях-мишенях, к ситуации, потенциально ассоции-

рованной со связанными с возрастом заболеваниями, такими как инсулинорезистентность (Schriock et al., 1988 and Coleman et al., 1982) и ожирение (Nestler et al., 1988; MacEwen and Kurman, 1991, and Tchernof et al., 1995). Кроме того, большое внимание уделялось преимуществам DHEA, вводимого постменопаузальным женщинам, особенно в отношении кости, кожи, вагины, метаболизма глюкозы и инсулина, массы жира, а также самочувствия после перорального (Villareal and Holloszy, 2004; Baulieu et al., 2000; Morales, et al., 1994; и Kawano et al., 2003) и подкожного (Diamond et al., 1996 и Labrie Diamond et al., 1997) введения. Таким образом, становилось особенно важным получение более точного знания о биодоступности, фармакокинетике и метаболизме DHEA после этих двух способов введения.

Поскольку авторы этого изобретения уже показали, с использованием фармакологической дозы DHEA, вводимой чрескожно в течение 2 недель, что измерения уровней сывороточного тестостерона (тесто) и эстрадиола (E2) не обеспечивают надежной оценки истинного внутриклеточного пула андрогенов и эстрогенов (Labrie, Belanger et al., 1997; Labrie, Belanger et al., 2006 и Labrie, Belanger, et al, 2007b), авторы этого изобретения сравнили сывороточные уровни DHEA и девяти стероидов, о которых известно, что они наиболее тесно ассоциированы с активными андрогенами и эстрогенами и их метаболитами. Подробный анализ 24-часовых изменений сывороточных уровней стероидов выполняли в первый день и после 2 недель ежедневного введения DHEA пероральным способом, а также чрескожно с использованием крема или геля DHEA.

2. Субъекты и способы.

Тридцать шесть здоровых 60-70-летних постменопаузальных женщин участвовали в этом исследовании после одобрения IRB и предоставления их письменного информированного согласия. Масса тела была в пределах $\pm 20\%$ нормальной массы тела в соответствии с Metropolitan Life Tables.

Ни один субъект не страдал от существенного метаболического или эндокринного нарушения, коронарной болезни или гипертензии. Ни одна женщина не лечилась андрогенами или анаболическими стероидами в пределах 6 месяцев перед визитом для участия в скрининге. Все участники имели медицинскую историю, полное физическое обследование и биохимический профиль сыворотки, включающий в себя липиды, клинический анализ крови, анализ мочи и подробные определения сывороточных гормонов во время фазы скрининга этого протокола.

3. Программа исследования, лечение и измерения.

Это исследование было рандомизированным, открытым исследованием из 12 субъектов на ветвь исследования. После получения письменного информированного согласия и установления, что женщины являются подходящими для исследования, каждого субъекта рандомизировали для получения DHEA посредством крема, геля или перорально. Ежедневно, перед завтраком, в течение 14 дней, субъекты получали, в этой исследовательской клинике, либо 4 г 10% DHEA-крема, наносимого на общую площадь 30 см \times 30 см бедра, либо две капсулы по 50 мг DHEA перорально перед завтраком.

Взятие проб крови выполняли при 08:00-09:00 ч при скрининге и перед применением DHEA, в первый день принятия доз, а также в дни 2, 4, 7, 10 и 14. В первый и 14-й дни, пробы крови получали при 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 и 24 ч после введения DHEA.

4. Анализ сывороточных стероидов.

DHEA, DHEA-S, андрост-5-ен-3 β ,17 β -диол (5-диол), тестостерон, андростендион (4-дион), 17 β -эстрадиол (E₂), эстрон (E₁), сульфат эстрона (E₁-S), глюкуронид андростерона (ADT-G) и глюкуронид андростан-3 β ,17 β -диола (3 α -диол-G) измеряли газовой хроматографией/масс-спектрометрией (DHEA, 5-диол, 4-дион, тестостерон, E₁ и E₂) с использованием электронной ионизации (удара электронов) или химической ионизации и жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии с использованием турбоионспрея (DHEA-S, E₁-S, ADT-G и 3 α -диол-G), как описано (Labrie, Belanger et al., 2006; Labrie, Belanger, et al., 2007b и Swanson et al., 2007).

5. Расчеты и статистический анализ.

В дни 1 и 14, измеряли площадь под кривой концентрации в сыворотке каждого стероида между 0 ч и 24 ч (AUC_{0-24ч}). Эти площади под кривыми рассчитывали линейным трапецидальным способом (независимым от модели). Относительную биодоступность геля DHEA, крема DHEA и капсул DHEA рассчитывали на основе среднего различия в log-трансформированных величинах AUC. Все расчеты выполняли с использованием программы SAS (SAS Institute, Cary, NQ USA).

6. Результаты.

Пероральное введение двух капсул 50 мг DHEA приводило к увеличению сывороточного DHEA от 2,3 \pm 0,3 нг/мл до максимальной величины 15,6 \pm 2,5 нг/мл при 1 ч с прогрессирующим уменьшением после этого до 5,7 \pm 0,5 нг/мл при 6 ч с последующим плато до 24 ч (фиг. 11A). При нанесении 4 г 10% геля или крема DHEA на площадь 30 \times 30 см кожи бедер, сывороточные уровни DHEA начинали увеличиваться только при 12 ч, достигая величин 8,2 \pm 2,0 и 8,0 \pm 1,2 нмоль/л, соответственно, при 24 ч (фиг. 11A). Не было значимого различия между кремом или гелем в сывороточных уровнях DHEA при любом из исследованных временных интервалов до 24 ч после первого нанесения этого стероида-предшественника на кожу.

При измерении сывороточного 5-диола после перорального введения DHEA, концентрация 5-диола

увеличивалась от концентрации перед лечением $0,31 \pm 0,03$ нг/мл до максимальной величины $1,19 \pm 0,13$ нг/мл при 1 ч с последующим прогрессирующим уменьшением после этого с достижением $0,79 \pm 0,05$ нг/мл при 24 ч (фиг. 11B). На той же самой фигуре можно видеть, что сывороточные уровни 5-диола увеличивались гораздо более медленно после введения ДНЕА чрескожно посредством крема или геля с достижением первых статистически различных величин $1,00 \pm 0,14$ нг/мл для крема и $0,72 \pm 0,14$ нг/мл для геля при 24 ч.

После перорально введенного ДНЕА, сывороточный 4-дион увеличивался от $0,6 \pm 0,1$ нг/мл до максимальной величины $9,5 \pm 2,2$ нг/мл при 1 ч с последующим быстрым уменьшением до величин, которые оставались на плато приблизительно $1,2$ нг/мл между 8 и 24 ч (фиг. 12A). С другой стороны, после введения ДНЕА посредством крема или геля, первое значимое увеличение сывороточного 4-диона наблюдали только при 24 ч при величинах $0,9 \pm 0,1$ и $0,8 \pm 0,1$ нг/мл для крема и геля, соответственно.

Сравнимую картину наблюдали для сывороточного тестостерона. Действительно, после перорального введения двух капсул по 50 мг ДНЕА, сывороточный тестостерон увеличивался от $0,38 \pm 0,03$ нг/мл до максимальной величины $0,79 \pm 0,14$ нг/мл при 1 ч. После этого увеличения следовало быстрое уменьшение до $0,30 \pm 0,08$ нг/мл при 6 ч с последующим плато после этого до 24 ч (фиг. 12B). При нанесении ДНЕА в виде крема или геля, первое увеличение наблюдали при 24 ч при величине приблизительно $0,45$ нг/мл. Как можно видеть на фиг. 13A и B, первое введение ДНЕА пероральным или чрескожным способом не имело статистически значимого действия на сывороточные уровни E_1 или E_2 во время первых 24 ч.

С другой стороны, сывороточный ДНЕА-S имел картину, хотя слегка задержанную, сравнимую с ДНЕА и 5-дионом после перорального введения двух капсул по 50 мг (фиг. 14A). Таким образом, сывороточный ДНЕА-S увеличивался от $0,4 \pm 0,1$ мкг/мл до $7,7 \pm 1,0$ мкг/мл при 1 ч и до максимальной величины $8,4 \pm 0,6$ мкг/мл при 2 ч с прогрессирующим уменьшением до $2,7 \pm 0,3$ мкг/мл при 24 ч. Не наблюдали значимого изменения сывороточного ДНЕА-S во время первых 24 ч после введения ДНЕА в виде крема или геля. С другой стороны, сывороточный E_1 -S не изменялся значимо во время первых 24 ч после первого введения.

Сывороточный ADT-G, основной метаболит андрогенов, увеличивался от 14 ± 3 нг/мл до 760 ± 150 нг/мл при 1 ч и 790 ± 140 нг/мл при 2 ч с последующим прогрессирующим уменьшением до 92 ± 5 нг/мл при 12 ч и до 70 ± 5 нг/мл при 24 ч (фиг. 15A). С другой стороны, сывороточный 3 α -диол-G увеличивался от $2,2 \pm 0,5$ нг/мл до $14,5 \pm 2,0$ нг/мл при 2 ч (фиг. 15B). Однако, наблюдаемое после этого уменьшение для 3 α -диол-G было гораздо более медленным, чем уменьшение ADT-G, причем наблюдается уменьшение только приблизительно 40% между 2 и 24 ч после перорального введения ДНЕА. После нанесения 4 г 10% ДНЕА на кожу, не было значимого изменения сывороточного ADT-G или 3 α -диол-G до 24 ч (фиг. 15B).

При повторении измерений тех же самых кинетических параметров на 14-ый день ежедневного введения доз можно было видеть, что введение двух капсул по 50 мг ДНЕА приводило, от величины перед введением доз $4,2 \pm 0,4$ нг/мл к максимальной концентрации $14,8 \pm 4,4$ нг/мл ДНЕА при 1 ч с последующим прогрессирующим уменьшением после этого до $4,5 \pm 0,4$ нг/мл при 24 ч (фиг. 16A). С другой стороны, при введении ДНЕА посредством крема или геля, не наблюдали значимого изменения во время 24-часового периода, и сывороточный ДНЕА оставался между 10 и 15 нг/мл после нанесения крема и между 7 и 11 нг/мл после нанесения геля.

Подобным образом, при измерении сывороточного 5-диола на 14-ый день лечения, сывороточная концентрация этого стероида увеличивалась от $0,46 \pm 0,04$ до $1,37 \pm 0,21$ нг/мл при 1 ч с медленным уменьшением после этого до достижения $0,64 \pm 0,06$ нг/мл при 24 ч (фиг. 16B). Как наблюдали для ДНЕА, сывороточный 5-диол оставался близ постоянным во время 24-часового периода при приблизительно $1,5$ - $1,9$ нг/мл после нанесения крема и $1,0$ - $1,3$ нг/мл после нанесения геля.

При измерении сывороточного 4-диона на 14-ый день введения доз, сывороточная концентрация этого стероида увеличивалась от $1,3 \pm 0,2$ нг/мл до максимальной величины $9,8 \pm 1,7$ нг/мл при 1 ч с последующим быстрым уменьшением до $1,5 \pm 0,1$ нг/мл при 6 ч с величиной $1,2 \pm 0,1$ нг/мл, измеренной при 24 ч (фиг. 17A). После нанесения ДНЕА на кожу в виде крема или геля, было незначимое увеличение сывороточного 4-диона до приблизительно $2,5$ нг/мл при 2 ч с величинами, после этого, остающимися на плато при $1,0$ - $1,6$ нг/мл до 24 ч (фиг. 17A).

Сывороточный тестостерон увеличивался на 14-й день введения доз после перорального введения 100 мг ДНЕА от $0,31 \pm 0,04$ нг/мл до максимальной величины $0,83 \pm 0,11$ нг/мл при 1 ч с последующим прогрессирующим уменьшением до величины $0,37 \pm 0,04$ нг/мл при 24 ч (фиг. 17B). После нанесения ДНЕА в виде крема или геля, сывороточные уровни тестостерона оставались неизменными во время 24-часового периода при приблизительно $0,3$ нг/мл, причем эта величина не отличалась значимо от величины перед лечением. Как наблюдали в первый день, не было значимого изменения в сывороточных уровнях E_1 (фиг. 18A) или E_2 (фиг. 18B) во время 24 ч после 14-дневного введения ДНЕА пероральным или чрескожным способом.

Сывороточный DHEA-S увеличивался от уровня перед введением доз $1,95 \pm 0,15$ мкг/мл до $8,3 \pm 0,4$ мкг/мл при 1 ч с последующим прогрессирующим уменьшением до $2,6 \pm 0,3$ мкг/мл при 24 ч (фиг. 19А). Не наблюдали значимого изменения сывороточного DHEA-S после нанесения DHEA на кожу. С другой стороны, сывороточный E₁-S, не изменялся во время 24 ч после 14-дневного введения DHEA пероральным или чрескожным способом.

При исходном более высоком уровне в день 14, чем в день 1, сывороточный ADT-G увеличивался быстро от 66 ± 1 до 996 ± 105 нг/мл при 1 ч с быстрым уменьшением после этого до 116 нг/мл при 12 ч и 91 ± 15 нг/мл при 24 ч (фиг. 20А). После нанесения DHEA на кожу не наблюдали значимого изменения сывороточных уровней ADT-G. С другой стороны, сывороточный 3 α -диол-G увеличивался от $12 \pm 2,5$ нг/мл до $29,4 \pm 5,5$ нг/мл при 2 ч с медленным уменьшением после этого до достижения $13 \pm 3,0$ нг/мл при 24 ч после 14-дневного перорального введения 100 мг DHEA. После чрескожного введения DHEA не наблюдали значимого изменения сывороточного 3 α -диол-G (фиг. 20В).

Затем, для получения более точного критерия накопления DHEA и его метаболитов, авторы этого изобретения сравнивали площади под кривыми концентраций сывороточных стероидов (величины AUC_{0-24ч}), измеренных в 1-ый и 14-ый дни введения доз. Как может быть предсказано из фиг. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и фиг. 20, эти величины AUC_{0-24ч} всех стероидов, за исключением метаболитов эстрогенов (E₁-S) и андрогенов (ADT-G и 3 α -диол-G), вследствие некоторого накопления этих стероидов, являются сходными в 1-й и 14-й дни введения DHEA пероральным способом (табл. 4). С другой стороны, после чрескожного введения, вследствие более медленной абсорбции DHEA после введения в виде крема или геля, на 155 и 86% более высокие величины AUC_{0-24ч} DHEA наблюдаются на 14-й день в сравнении с первым днем введения доз, соответственно. Более высокие величины наблюдаются также для всех других стероидов, за исключением величин для E₁, E₂ и тестостерона, которые не обнаруживали.

Таблица 4. Величины AUC_{0-24ч}, измеренные в 1-й и 14-й дни введения доз, а также их отношение

Стероид	DHEA (нг.ч/мл)	5-диол (нг.ч/мл)	4-диол (нг.ч/мл)	Тестостерон (нг.ч/мл)	E1 (пг.ч/мл)	E2 (пг.ч/мл)	DHEA-S (мкг.ч/мл)	E1-S (пг.ч/мл)	ADT-G (нг.ч/мл)	3 α -диол-G (нг.ч/мл)
2 капсулы по 50 мг										
1-й день введения доз	153 (19)	19,0 (20)	40,2 (39)	9,47 (31)	745 (30)	136 (20)	108 (20)	4,81 (39)	4112(24)	259 (44)
14-ый день введения доз	144 (26)	20,4 (25)	43,6 (27)	9,72 (23)	910 (23)	165 (25)	95,0(16)	7,44 (36)	5607(28)	453 (41)
14-ый день/ 1-ый день	0,94	1,07	1,08	1,03	1,22	1,21	0,88	1,55	1,36	1,75
4 г 10% крема										
1-й день введения доз	107 (33)	13,7 (31)	12,3 (43)	8,35 (16)	680 (48)	147 (50)	10,7 (45)	4,83 (58)	404 (62)	50,6 (93)
14-ый день введения доз	273 (36)	39,7 (31)	22,8 (33)	8,77 (16)	847 (22)	175 (27)	19,9(34)	7,96 (39)	977 (66)	114 (104)
14-ый день/ 1-ый день	2,55	2,90	1,85	1,00	1,24	1,19	1,86	1,65	2,42	2,25
4 г 10% геля										
1-й день введения доз	101 (49)	10,3 (55)	13,3 (45)	8,76 (16)	620 (31)	214(137)	11,2 (35)	5,53 (84)	254 (30)	38,3 (86)
14-ый день введения доз	188 (30)	27,2 (32)	21,3 (51)	8,04 (22)	785 (40)	152 (24)	18,6(34)	9,11(106)	455 (23)	60,3 (85)
14-ый день/ 1-ый день	1,86	2,64	1,60	0,96	1,27	0,71	1,66	1,65	1,79	1,57

Величины в скобках обозначают процентный коэффициент вариации. DHEA вводили пероральным способом (2 капсулы по 50 мг) или нанесением на кожу 4 г 10% крема или геля DHEA.

Как можно ясно видеть в таблице 5 и на фиг. 21, не было значимого изменения величин $AUC_{0-24ч}$ сывороточных E_1 , E_2 или тестостерона, измеренных в 14-й день введения доз в сравнении с уровнями перед введением доз. Однако значимые увеличения наблюдали для двух других стероидов. Так, после ежедневного перорального введения 100 мг DHEA в течение 2 недель площадь под кривой концентрации DHEA, измеренная во время 24 ч после введения этого стероида, увеличивалась на 167% относительно величины перед лечением, тогда как для 5-диола, 4-диона, DHEA-S, E_1 -S, ADT-G и 3 α -диол-G наблюдали соответствующие увеличения 138, 238, 873, 60, 1820 и 874%.

Таблица 5. Величины $AUC_{0-24ч}$ DHEA и его метаболитов перед лечением и в 14-й день

Стероид	DHEA (нг.ч/мл)	5-диол (нг.ч/мл)	4-дион (нг.ч/мл)	Тесто- стерон (нг.ч/мл)	E_1 (пг.ч/мл)	E_2 (пг.ч/мл)	DHEA-S (мкг.ч/мл)	E_1 -S (пг.ч/мл)	ADT-G (нг.ч/мл)	3 α -диол- G (нг.ч/мл)
Фон (перед обработ- кой)	53,9	8,56	12,9	8,72	717	135	9,76	4,64	292	46,6
(A) 2 капсулы по 50 мг										
14-й день введе- ния доз	144	20,4	43,6	9,72	910	165	95,0	7,44	5607	453
14-ый день/ 1-ый день	2,67	2,38	3,38	1,11	1,27	1,22	9,73	1,60	19,2	9,74
(B) 4 г 10% крема										
14-й день введе- ния доз	5,06	4,63	1,77	1,01	1,18	1,30	2,04	1,72	3,34	2,45
14-ый день/ 1-ый день	1,86	2,64	1,60	0,96	1,27	0,71	1,66	1,65	1,79	1,57
(C) 4 г 10% геля										
14-й день введе- ния доз	188	27,2	21,3	8,04	785	152	18,6	9,11	455	60,3
14-ый день/ 1-ый день	3,49	3,18	1,65	0,92	1,09	1,13	1,91	1,96	1,56	1,30

DHEA вводили пероральным способом или чрескожно посредством крема или геля. Фоновые величины $AUC_{0-24ч}$ рассчитывали умножением уровней сывороточных стероидов перед обработкой, включающей в себя скрининг, на 24 ч.

За исключением DHEA и 5-диола, более низкие увеличения наблюдали после введения крема или геля DHEA. Действительно, после нанесения крема DHEA, величина $AUC_{0-24ч}$ DHEA-S увеличивалась только на 104%, в то время как величины $AUC_{0-24ч}$ 4-диона, E_1 -S, ADT-G и 3 α -диол-G увеличивались на 77, 72, 234 и 145% выше контроля, соответственно. С другой стороны, величины AUC для DHEA и 5-диола увеличивались на 406 и 363%, соответственно (табл. 5, фиг. 21). Сравнимые, но несколько более низкие увеличения наблюдали с гелем DHEA, где величины $AUC_{0-24ч}$ сывороточных 4-диона, DHEA-S, E_1 -S, ADT-G и 3 α -диол-G увеличивались на 65, 91, 96, 56 и 30% выше контроля, тогда как величины $AUC_{0-24ч}$ для DHEA и 5-диола увеличивались на 249 и 238%, соответственно.

Недавние открытия авторов этого изобретения (Labrie, Belanger et al., 2007b) показали, что изменения сывороточного DHEA, наблюдаемые после введения экзогенного DHEA, являются завышенной по меньшей мере на 100% оценкой истинных изменений в образовании половых стероидных гормонов. В поддержку этих данных, фиг. 21 показывает, что после введения DHEA посредством крема или геля изменения сывороточного DHEA являются заметным завышением изменений сывороточных уровней всех измеренных стероидов, за исключением 5-диола, непосредственного метаболита DHEA. Для крема DHEA, изменения величин $AUC_{0-24ч}$ сывороточных 4-диона, DHEA-S, E_1 -S, ADT-G и 3 α -диол-G составляют только 77, 104, 72, 234 и 145% в сравнении с увеличением 406% относительно уровней перед обработкой, наблюдаемых для сывороточного DHEA.

Для андрогенов, теперь хорошо установлено, что уридинглюкуронозилтрансфераза 2B7 (UGT 2B7),

UGT 2B15 и UGT 2B17 являются тремя ферментами, ответственными за глюкуронидирование всех андрогенов и их метаболитов в человеке (Belanger et al., 2003). Это недавнее завершение идентификации и характеристики всех UDT-глюкуронозилтрансфераз делает возможным применение глюкуронидных производных андрогенов в качестве маркеров общей андрогенной активности как в женщинах, так и в мужчинах (Labrie, Belanger et al., 2006; Labrie, Belanger, et al, 2007b и Swanson et al., 2007). Таким образом, поскольку все андрогены метаболизируются в ADT-G и 3 α -диол-G, эта оценка процента эффективности чрескожного DHEA в отношении превращения в активные андрогены оценивается, следовательно, как 52% при добавлении изменений в ADT-G и 3 α -диол-G (взвешенная величина 211% в сравнении с изменениями DHEA 406%). Подобным образом, после введения геля DHEA, увеличение 249% сывороточного DHEA переводится в увеличения только 65, 91, 96, 56 и 30% в величинах AUC_{0-24ч} сывороточного 4-диона, DHEA-S, E₁-S1, ADT-G и 3 α -диол-G, соответственно.

Поскольку высокий уровень глюкуронидирования в кишечнике и печени объясняет высокий сывороточный уровень ADT-G и 3 α -диол-G (Belanger et al., 2003) после перорального введения DHEA, относительно малое увеличение сывороточного E₁-S (60%) в сравнении с увеличением 167% сывороточного DHEA после введения перорального DHEA указывает на 36% относительную эффективность превращения в эстрогены. Как показано ранее (Labrie, Belanger et al., 1997; Labrie, Belanger et al., 2006; Labrie, Belanger, et al., 2007b), эти результаты указывают на то, что DHEA, вводимый постменопаузальным женщинам, превращается преимущественно в андрогены, а не в эстрогены. Обсуждение

Представленные результаты ясно показывают, что во время продолжительного лечения с использованием DHEA в виде крема или геля концентрация всех стероидов быстро достигает плато без детектируемого изменения сывороточной концентрации любого из стероидов, измеренной во время ежедневного нанесения DHEA на кожу. Таким образом, от 24 ч после первого введения DHEA чрескожно, концентрация всех стероидов остается на одном и том же уровне, свидетельствуя о том, что ежедневное нанесение DHEA на кожу поддерживает постоянные сывороточные уровни DHEA и всех его метаболитов. В постменопаузальных женщинах, как уже известно, циркадное варьирование сывороточного DHEA является относительно малым в сравнении с ситуацией в имеющих нормальный менструальный цикл предменопаузальных женщинах (Lui and Laughlin, 1990).

Представленные результаты показывают также, что после ежедневного перорального введения DHEA, нет значимого накопления DHEA или его метаболитов. Кроме того, метаболизм DHEA после его введения пероральным или чрескожным способом является количественно сходным, причем качественные различия объясняются кишечно-печеночным метаболизмом после перорального введения.

Более высокие величины AUC_{0-24ч} сывороточных DHEA-S, ADT-G и 3 α -диол-G, объединенные с более низкими величинами AUC_{0-24ч} DHEA и 5-диола после перорального введения в противоположность чрескожному введению, показывают, что метаболизм через желудочно-кишечный тракт и/или первое прохождение через печень приводит не только к более высокому уровню превращения DHEA в DHEA-S вследствие активности DHEA-сульфотрансферазы (Luu-The et al., 1995), но также к увеличенному метаболизму DHEA в андрогены и их инактивации вследствие активности печеночных глюкуронозилтрансфераз (Belanger et al., 2003; Turgeon et al., 2001 и Hum et al., 1999). Действительно, как показано в табл. 1, подвергание действию DHEA 144 нг·ч/мл (AUC_{0-24ч}) на 14-й день перорального введения 100 мг DHEA приводит к величинам AUC_{0-24ч} 5607 нг·ч/мл и 453 нг·ч/мл для ADT-G и 3 α -диол-G, соответственно. С другой стороны, после чрескожного введения 10% крема DHEA, величины AUC для DHEA, ADT-G и 3 α -диол-G равны 273, 977 и 114 нг·ч/мл, соответственно. Таким образом, после перорального введения, 1 нг·ч/мл DHEA соответствует величине AUC 42,1 нг·ч/мл для комбинации двух метаболитов андрогенов (ADT-G+3 α -диол-G), тогда как после нанесения крема, подвергание 1 нг·ч/мл DHEA соответствует 4,0 нг·ч/мл для этой суммы двух метаболитов андрогена. Такие данные показывают, что введение DHEA пероральным способом приводит к приблизительно в 10 раз более высокому уровню превращения DHEA в ADT-G и 3 α -диол-G, чем после чрескожного введения, по меньшей мере при используемых дозах. При выполнении тех же самых расчетов для результатов, полученных после введения DHEA посредством геля, подвергание 1 нг·ч/мл DHEA сопровождается величиной AUC_{0-24ч} 2,7 нг·ч/мл для ADT-G+3 α -диол-G, что указывает даже на более высокое соотношение между пероральным и чрескожным введением DHEA.

Как показано в табл. 4, в то время как величина AUC_{0-24ч} DHEA 1 нг·ч/мл приводит к величине AUC_{0-24ч} 660 нг·ч/мл для DHEA-S после перорального введения DHEA, соответствующие величины 73 и 99 нг·ч/л наблюдаются после нанесения стероида-предшественника посредством крема или геля. Таким образом, имеется в 6,7-9,0 раз более высокое количество DHEA-S в кровотоке после того же самого подвергания действию циркулирующего DHEA (сывороточная величина AUC_{0-24ч}) после перорального введения в сравнении с чрескожным введением DHEA при испытанных условиях. Эти результаты показывают сравнимое влияние прохождения DHEA через желудочно-кишечный тракт и печень на сывороточные уровни DHEA-S, ADT-G и 3 α -диол-G.

Хотя можно видеть более низкое различие, относительно более высокие уровни сывороточного 4-диона наблюдаются после перорального введения DHEA в сравнении с чрескожным введением стероида-

предшественника. Так, после перорального введения DHEA, величина $AUC_{0-24ч}$ 1 нг·ч/мл приводит к величине $AUC_{0-24ч}$ 0,3 нг·ч/мл 4-диона, в то время как величины 0,08 и 0,11 нг·ч/мл наблюдаются после введения DHEA посредством крема и геля, соответственно. Как измерено в кровотоке, превращение DHEA в 4-дион является, следовательно, в 2,70-3,76 раз более высоким после перорального введения в сравнении с чрескожным введением DHEA.

Результаты табл. 5 показывают, что величина $AUC_{0-24ч}$ DHEA увеличивается на 167% над контролем после ежедневного перорального введения 100 мг DHEA в сравнении с фоновыми уровнями перед обработкой, тогда как ежедневное чрескожное введение 4 г 10% крема и геля DHEA увеличивает сывороточные уровни DHEA на 406 и 249%, соответственно. Поскольку на кожу наносили 400 мг DHEA в сравнении с 100 мг в случае перорального способа, и при предположении линейности, представленные данные указывают на то, что пероральный способ является в 2,9 и в 4,8 раза более эффективным в сравнении с препаратом, используемым для крема или геля DHEA, соответственно.

В одном исследовании, также выполняемом на постменопаузальных женщинах, пероральное введение 150 мг и 300 мг измельченного на микронной коллоидной мельнице DHEA приводило к максимальным сывороточным уровням DHEA-S, DHEA и тестостерона приблизительно 1,5, 15 и 2,75 нг/мл после дозы 300 мг и 10 мкг/мл, 12 мкг/мл и 1,6 нг/мл после дозы 150 мг DHEA, соответственно (Buster et al., 1992). Исследование этих ранних результатов показывает, что 20-кратное увеличение сывороточного DHEA-S приводило лишь к 6,9-кратному увеличению сывороточного тестостерона, в то время как сывороточный DHEA увеличился 11,6-кратно. Кроме того, коррекции измеренных величин сывороточного тестостерона до одной трети с учетом двух третей неспецифического связывания в радиоиммуноанализе, эти сывороточные уровни тестостерона остаются в пределах физиологических уровней на протяжении 12 ч после введения дозы 150 мг DHEA (Buster et al., 1992).

Сходные различия, наблюдаемые между пероральным и чрескожным способами введения для сывороточного DHEA, наблюдаются для 5-диола, который превращается непосредственно из DHEA 17 β -гидроксистероиддегидрогеназой (Labrie, Luu-The, et al., 2000). Действительно, величина $AUC_{0-24ч}$ 5-диола увеличивается на приблизительно 138% выше контроля после перорального введения 100 мг DHEA, и увеличения 363 и 218% измерены после нанесения 400 мг крема и геля DHEA, соответственно.

Как упоминалось выше, человек является уникальным, с некоторыми другими приматами, в том, что он имеет надпочечники, которые секретируют большие количества стероидов-предшественников DHEA и DHEA-S, которые превращаются в 4-дион и затем в активные андрогены и/или эстрогены в периферических интракринных тканях (Labrie, 1991; Labrie, Belanger, et al., 1995; Labrie et al., 1996; Labrie, Luu-The, et al., 1997; Simpson, 2000; Labrie, Luu-the, et al., 2005; Labrie, Poulin, et al., 2006 and Labrie, Belanger, et al., 1998). Удивительно также, что человек, наряду с наличием в нем очень сложных эндокринной и паракринной систем, щедро наделен образованием половых стероидных гормонов в периферических тканях (Labrie, 1991) и (Belanger, et al., 1998). Действительно, в то время как яичники и яички являются единственными источниками андрогенов и эстрогенов в низших млекопитающих, ситуация очень отличается в человеке и высших приматах, где активные половые стероидные гормоны синтезируются в значительной части или полностью локально в периферических тканях, обеспечивая тем самым ткани-мишени контролями, которые корректируют образование и метаболизм половых стероидных гормонов для локальных потребностей.

Секреция надпочечниками DHEA и DHEA-S увеличивается во время физиологического полового созревания в детях в возрасте 6-8 лет, и максимальные величины циркулирующего DHEA-S достигаются между возрастом 20 лет и возрастом 30 лет. После этого, сывороточные уровни DHEA и DHEA-S заметно уменьшаются (Belanger et al., 1994). Фактически, при возрасте 70 лет сывороточные уровни DHEA-S уменьшаются до приблизительно 20% их максимальных величин, в то время как они могут иметь уменьшение на 95% при возрасте 85-90 лет (Belanger et al., 1994) и (Migeon et al., 1957). Это 70-95% уменьшение в образовании DHEA и DHEA-S надпочечниками во время старения приводит к разительному уменьшению образования андрогенов и эстрогенов в периферических тканях-мишенях (Labrie, Belanger et al., 2006). Такое ярко выраженное уменьшение в образовании половых стероидных гормонов в периферических тканях может, вероятно, участвовать в патогенезе ряда ассоциированных со старением заболеваний.

Как упоминалось ранее, трансформация (превращение) DHEA и DHEA-S в активные андрогены и/или эстрогены в периферических тканях-мишенях зависит от уровня экспрессии различных стероидогенных и метаболизирующих ферментов в каждом типе клеток (Labrie, 1991). Выяснение структуры большинства этих тканеспецифических генов, которые кодируют стероидогенные ферменты, ответственные за превращение DHEA и DHEA-S в андрогены и/или эстрогены, позволило достичь быстрого прогресса в этой области (Labrie, Belanger et al., 1995; Labrie, Luu-The et al., 1997; Labrie, Simard et al., 1996; Labrie, Luu-The et al., 2005; Labrie, Poulin et al., Labrie, Luu-The, et al., 2000, Labrie, Sugimoto, et al., 1992, Labrie, Simard et al., 1992; Luu-The, et al., 1995; и Labrie, Durocher et al., 1995).

Результаты, показывающие присутствие относительно высоких уровней метаболитов андрогенов в здоровых женщинах (Labrie, Belanger, et al., 1997; Labrie, Belanger et al., 2006; Labrie, and Belanger, et al., 2007b), в сильной степени предполагает, что андрогены играют главную физиологическую, но все еще

недооцениваемую роль в женщинах. 44,5%-ное уменьшение, которое имеет место в сывороточном DHEA в возрасте от 20-30 лет до возраста 40-50 лет в женщинах (Belanger et al., 2006) могло бы вполне приемлемо объяснить разрежение кости, которое предшествует менопаузе. Действительно, сообщалось, что связанное с возрастом разрежение кости (остеопороз) начинается на четвертом десятке, и изменения в метаболизме костной ткани были обнаружены задолго перед менопаузой (Mazess 1982; Riggs, et al., 1981, and Johnston et al., 1985). В соответствии с этими открытиями, плотность костной ткани была более низкой при всех участках, испытанных в женщинах, классифицируемых как перименопаузальные (околоклимактерические) (Steinberg, et al., 1989). В соответствии с этими открытиями, изменения секреции предшественника андрогена надпочечниками предшествуют на 10-20 лет уменьшению секреции эстрогена яичников, которая резко прекращается при менопаузе (Labrie, Belanger, et al., 2006).

Важно понять, что происходит уменьшение не только сывороточных DHEA и DHEA-S на 50% между возрастом 21 год и возрастом 50 лет, но и подобное уменьшение сывороточного тестостерона (Zuttoff et al., 1995). Такие данные могли бы вполне предполагать, что гормональная заместительная терапия с использованием андрогенов или их предшественника (предшественников) должна начинаться рано в менопаузе для компенсации этого раннего уменьшения секреции предшественников андрогенов надпочечниками и параллельного уменьшения в сывороточном тестостероне (Labrie, 2006).

Активные андрогены и эстрогены, синтезируемые в периферических тканях, проявляют их активность в клетках их происхождения, и происходит очень малая диффузия этих активных половых стероидных гормонов, что приводит к очень низким уровням в кровообращении (кровоотоке). Действительно, как наблюдалось ранее (Labrie, Belanger et al., 1997) и подтверждается в данном изобретении, наиболее поразительные действия введения DHEA наблюдаются на циркулирующих уровнях глюкуронидных производных метаболитов DHT, а именно, ADT-G и 3 α -диол-G, в то время как не наблюдаются значимые изменения или наблюдаются только минорные изменения в сывороточных уровнях тестостерона, E₁ или E₂. Эти активные стероиды продуцируются локально в периферических интракринных тканях, которые имеют подходящие стероидогенные ферменты для синтеза DHT из присутствующих в надпочечниках DHEA и DHEA-S, а также ферменты, которые превращают DHT в неактивные метаболиты ADT и 3 α -диол, которые дополнительно модифицируются глюкуронидированием (Belanger et al., 2003).

В одном недавнем исследовании, ежедневное пероральное введение 50 мг DHEA не оказывало значимого действия на сывороточные тестостерон или DHT, тогда как DHEA и ADT-G увеличивались до сходной степени (80-90%) (Arlt et al., 2001). В другом исследовании, сывороточные уровни DHEA-S перед введением доз в постменопаузальных женщинах увеличивались от 0,55 до приблизительно 1,4 мкг/мл (Casson et al., 1998) после перорального введения 25 мг DHEA в течение 6 месяцев. Однако, сывороточные уровни DHEA и тестостерона, измеренные спустя 23 ч после последнего введения DHEA, не изменялись значимо. Другое исследование показало, что ежедневная доза 50 мг DHEA приводит к сывороточным уровням андрогена в предменопаузальном диапазоне (Buster et al., 1992).

Представленные данные ясно демонстрируют, что DHEA и DHEA-S превращаются в специфических периферических интракринных тканях в активные андрогены и/или эстрогены, которые могут проявлять их биологические действия в месте их синтеза без высвобождения или только с малым высвобождением активных стероидов в кровоток. Таким образом, изменения сывороточных уровней тестостерона, E₁ или E₂ не могут быть использованы в качестве параметров превращения DHEA в андрогены или эстрогены (Labrie, Belanger et al., 2006). Действительно, активные стероиды метаболизируются в тех же самых клетках, в которых они были синтезированы, и проявляют их действие в неактивных глюкуронидированных и сульфатированных метаболитах, которые в конечном счете диффундируют во внеклеточное пространство и могут быть измерены в кровотоке (Labrie, Belanger et al., 2006; Labrie, Belanger et al., 1997 и Labrie, Belanger et al., 2007). Измерение конъюгированных метаболитов андрогенов является единственным подходом, который позволяет точно оценить общий пул андрогенов в женщинах. Наиболее вероятно, что подобная ситуация существует и для эстрогенов, хотя точная оценка фармакокинетики метаболизма эстрогенов и идентификация их метаболитов еще требуют установления.

Пример 3.

Клиническое исследование ERC-210.

Интравагинальный DHEA, физиологическое лечение вагинальной атрофии.

Объекты и способы.

Это исследование является исследованием фазы III, проспективным (перспективным), многоцентровым, рандомизированным, плацебоконтролируемым и двойным слепым исследованием с 50 субъектами на каждую ветвь исследования (всего 200 субъектов). Таким образом, двести постменопаузальных женщин рандомизировали для получения ежедневной влагалитической овулы следующих концентраций DHEA: 0,0, 0,25 (3,25 мг DHEA), 0,5 (6,5 мг DHEA) или 1,0% (13 мг DHEA), вводимой интравагинально при помощи инструмента для локального применения лекарственного средства. Это исследование делили на две фазы, а именно, скрининг с последующим периодом лечения (обработки) с продолжительностью 12 недель. Критерии включения (в исследование) были следующими: постменопаузальные женщины, которые удовлетворяют а или b или с:

а) отсутствие менструальных циклов в течение по меньшей мере одного года; или
 б) уровни FSH > 40 mIU/мл (в пределах 60 дней перед днем 1) в женщинах без менструального цикла в течение > 6 месяцев, но < 12 месяцев, или женщин, подвергнутых гистерэктомии, которые были пременопаузальными в момент гистерэктомии; или

с) есть недель или более (визит в скрининге) после билатеральной оофорэктомии.

Женщины, которые сами обнаружили по меньшей мере один умеренный - тяжелый симптом из следующих симптомов:

вагинальной сухости (отсутствующей, легкой, умеренной или тяжелой),

вагинального и/или вульварного раздражения/зуда (отсутствующего, легкого, умеренного или тяжелого),

вагинальной боли, ассоциированной с половой активностью (отсутствующей, легкой, умеренной или тяжелой).

Женщины должны идентифицировать, какой симптом является наиболее беспокоящим для них в начале лечения. Изменение этого симптома будет отслеживаться и будет служить для оценивания эффекта лечения.

Женщины в возрасте между 40 и 75 годами.

Готовые участвовать и подписавшие информированное согласие.

Женщины, имеющие низкий индекс зрелости (не более чем 5% поверхностных клеток на вагинальном мазке).

Женщины, имеющие вагинальный pH выше 5.

Нормальная маммография в пределах 9 месяцев от начала исследования.

Нормальное исследование молочной железы.

Нормальный мазок PAP (который включает в себя воспалительные изменения) в пределах последних 12 месяцев (день 1). Для женщин, подвергнутых гистерэктомии, мазок будет состоять по меньшей мере из одного предметного стекла.

Отсутствие прежних или имеющихся к данному моменту наркотической аддикции или алкоголизма.

Масса тела в пределах 18,5-35 идеальной массы тела в соответствии с индексом массы тела (BMI) (WHO).

Отсутствие гепатического или ренального нарушения или состояния, о котором известно, что оно влияет на метаболизм лекарственных средств или стероидов.

Нормальные фоновая гематология, клиническая химия и анализ мочи.

Отрицательная серология на ВИЧ1/ВИЧ2 и гепатит В и С.

Критериями исключения были:

недиагностированное атипичное генитальное кровотечение,

прежняя диагностика рака, за исключением рака кожи (не меланомы),

эндометриальная гиперплазия при биопсии, выполняемой при скрининге, или рак эндометрия,

активное или анамnestическое тромбоземболическое заболевание,

существенное метаболическое или эндокринное заболевание,

клинически значимое желудочно-кишечное заболевание, заболевание печени или желчного пузыря,

рекуррентная головная боль (мигрень), не контролируемая общепринятой терапией,

сахарный диабет, не контролируемый общепринятой терапией,

существенное осложнение при предыдущей гормональной терапии,

применение только эстрогена в качестве инъекционной лекарственной терапии или имплантата прогестина в пределах 3 месяцев перед вступлением в исследование (визит в скрининге),

применение шарика эстрогена или инъекцируемого прогестинового лекарственного в пределах 6 месяцев перед вступлением в исследование,

подвергание пероральному введению эстрогена, прогестина или подвергание действию DHEA или внутриматочной прогестиновой терапии в течение восьми недель перед оценками фона,

вагинальные гормональные продукты (кольца, кремы или гели) или трансдермальный эстроген один или продукты эстроген/прогестин в пределах 4 недель перед оценками фона. Пациенты могут быть подвергнуты вымыванию следующим образом, но после необходимого периода вымывания они должны ответить на вопросы опросника по вагинальной атрофии:

по меньшей мере восьминедельный период вымывания для прежней пероральной терапии с использованием эстрогена, DHEA и/или прогестина;

по меньшей мере четырехнедельный период вымывания для прежней трансдермальной гормональной терапии;

по меньшей мере четырехнедельный период вымывания для доставляемой локально гормональной заместительной терапии для вагинальной сухости;

по меньшей мере 6 месяцев для прежней терапии инъекционной лекарственной терапии с использованием шарика эстрогена или прогестина;

восемь недель или более для прежней внутриматочной терапии с использованием прогестина;

шесть месяцев или более для прежних имплантатов прогестина и инъекционной лекарственной терапии с использованием только эстрогена,
 прежнее лечение андрогенами или анаболическими стероидами в пределах 3 месяцев перед визита для скрининга,

пероральное лечение кортикостероидами в пределах шести недель от начала исследования,
 не допускается продолжительное применение кортикостероидов (разрешается периодический назальный спрей или местное нанесение на кожу, в глаза или уши),

сердечная недостаточность или проявление коронарной болезни сердца,
 гипертензия, равная или превышающая 160/95 мм рт. столба или не контролируемая стандартной терапией,

подтвержденная клинически значимая депрессия или подтвержденная история тяжелого психиатрического расстройства,

введение любого исследуемого лекарственного средства в пределах 30 дней визита в скрининге,
 клинически релевантная атипичная биохимия сыворотки или гематология,

фоновая цервикальная цитология, показывающая повреждения плоскоклеточного эпителия низкой степени (LGSIL) или худшую картину,

курение более чем 10 сигарет в день,

лекарственные средства, которые мешают метаболизму эстрогенов (например, кетоконазол, ингибиторы образования или действия стероидов),

SERM или лекарственное средство, взаимодействующее с рецепторами стероидов,

известное или пальпируемое присутствие фибромы матки при гинекологическом обследовании,

нарушение свертывания крови или антикоагулянтная лекарственная терапия.

Лабораторные тесты.

Обычные лабораторные тесты, а именно, гематология (в том числе клинический анализ крови и коагуляцию), химию крови и анализ мочи выполняли при всех визитах. Сывороточный FSH должен был измеряться только в женщинах, которые не имели менструального цикла в течение >6 месяцев, но <12 месяцев, или которые были предменопаузальными в момент гистерэктомии. Сывороточные уровни стероидов DHEA, DHEA-S, андрост-5-ен-3 β ,17 β -диола (5-диола), дигидротестостерона (DHT), тестостерона (тесто), андростендиона (4-диола), эстрона (E₁), эстрадиола (E₂), E₁-S, глюкуронида андростерона (ADT-G), андростан-3 α ,17 β -диол-3G (3 α -диол-3G) и 3 α -диол-17G измеряли в Лаборатории Молекулярной Эндокринологии, Исследовательского Центра CHUL масс-спектрометрией, как описано (Labrie, Belanger et al., 2006; Labrie, Belanger et al., 2007; Labrie, Cusan et al., 2008).

Вагинальный pH и вагинальная цитология.

Для индекса зрелости и мазка Папаниколау (PAP), все пробы были исследованы цитопатологоанатомом (Dr. Robert Dube, Department of cytology-pathology, Enfant-Jesus Hospital, Quebec City, Canada), которому не были известны схемы лечения. Счет 100 клеток выполняли для классификации клеток как поверхностные (S), промежуточные (I) и парабазальные (P) типы клеток плоского эпителия (Meisels 1967; Wied 1993).

Вагинальные мазки получали соскобом средней трети боковой стенки вагины округленным концом шпателя Ауге. Затем этот материал наносили на стеклянное предметное стекло и немедленно фиксировали Spray-Cyte. Эти пробы отсылали в центральную лабораторию для определения индекса зрелости.

Вагинальный pH измеряли прикладыванием индикаторной полоски pH непосредственно к боковой стенке вагины пинцетом. Для мазка Папаниколау - если его не выполняли в течение последних 12 месяцев, образцы получали из эндоцервикса (слизистой оболочки канала шейки матки), экзоцервикса и свода вагины и немедленно фиксировали цитоспреем. Эти образцы собирали шпателем Ауге.

Эндометриальная биопсия.

Эндометриальную биопсию выполняли в скрининге и при месяце 3 в конце исследования. Все биопсии обследовались одним и тем же патологоанатомом в центральной лаборатории (Dr. Robert Dube, Department of cytology-pathology, Enfant-Jesus Hospital, Quebec City, Canada).

Вагинальное обследование.

При тех же самых временных интервалах 2, 4, 8 и 12 недель, гинеколог или врач, отвечающий за это исследование в каждом участке, выполняли обследование вагины для оценивания степени тяжести (отсутствующей, легкой, умеренной или тяжелой, анализируемой с использованием величин 0, 1, 2 и 3, соответственно) на основные симптомы вагинальной атрофии, а именно, вагинальные секреты, цвет вагины, целостность вагинального эпителия и толщина поверхности вагинального эпителия. Как можно видеть на фиг. 26-29, наблюдалось зависимое от времени, зависимое от дозы и статистически значимое улучшение всех четырех признаков вагинальной атрофии. Действительно, благоприятные эффекты, наблюдаемые гинекологом и/или врачом, являются почти совмещаемыми с эффектами, сообщаемыми женщинами в отношении их наиболее беспокоящих симптомов.

Вагинальное обследование выполняли в скрининге и затем в день 1 и в недели 2, 4, 8 и 12. Вагинальные секреты, цвет вагины, целостность вагинального эпителия и толщину поверхности вагинального

эпителии оценивали в соответствии со следующими степенями тяжести: отсутствующая, легкая, умеренная или тяжелая. Эти определения тяжести были следующими.

а) Вагинальные секреты.

Отсутствие атрофии: нормальные прозрачные секреты, отмеченные на вагинальных стенках.

Легкая: поверхностное покрытие секретов, трудность вставления зеркала.

Умеренная: недостаточный секрет, не покрывающий весь свод вагины, может требоваться смазывание при вставлении зеркала для предотвращения боли.

Тяжелая: отсутствие секрета, воспаленная вагина с заметным изъязвлением, требуется смазывание при вставлении зеркала для предотвращения боли.

б) Целостность вагинального эпителия.

Отсутствие атрофии: нормальная.

Легкая: вагинальная поверхность кровоточит при соскобе.

Умеренная: вагинальная поверхность кровоточит при легком контакте.

Тяжелая: вагинальная поверхность имеет капиллярные кровоизлияния (петехии) перед контактом и кровоточит при легком контакте.

в) Толщина вагинальной эпителиальной поверхности.

Отсутствие атрофии: складчатость и эластичность свода вагины.

Мягкая: слабая складчатость с отмеченной некоторой эластичностью свода вагины.

Умеренная: гладкая, некоторая эластичность свода вагины.

Тяжелая: гладкая, с отсутствием эластичности, сжатия верхней 1/3 вагины или потеря вагинального тонуса (грыжа мочевого пузыря и ректоцеле (выпадение прямой кишки)).

г) Цвет вагины.

Отсутствие атрофии: розовый.

Легкая: светлее по цвету.

Умеренная: бледнее по цвету.

Тяжелая: прозрачная, либо бесцветная, либо воспаленная.

Статистика.

Будут производиться суммарные табулирования (сведения в таблицы), которые представляют ряд наблюдений, среднее или геометрическое среднее, как будет целесообразно, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего, 95% двусторонний доверительный интервал (CI), медиану, минимум и максимум для непрерывных переменных и количество и процент на категорию для категорических данных. Статистические анализы выполняются при двустороннем уровне значимости 0,05, если нет другого указания. Эти категории для суммирования будут в основном состоять из уровней доз DHEA-обработок, 0% плацебо, 0,25, 0,5 и 1,0% DHEA.

Первичные конечные точки для анализа будут состоять из следующего.

Статистически значимого улучшения умеренного - тяжелого симптома, идентифицированного женщиной-субъектом как наиболее беспокоящего для нее. Эта тяжесть симптомов основана на симптомах увеличивающейся тяжести: отсутствующей, легкой, умеренной или тяжелой. Эти оценки будут анализироваться с использованием величин 0, 1, 2 и 3, соответственно; все субъекты должны иметь по меньшей мере один фоновый симптом, который классифицируется как 2 или 3. Представляющими интерес симптомами являются сухость вагины, вагинальное и/или вульварное раздражение/зуд и вагинальная боль, ассоциированная с половой активностью.

Статистически значимое уменьшение количества парабазальных клеток и статистически значимое увеличение количества поверхностных клеток. Эти данные измеряют в процентах. Будет также рассчитываться величина зрелости.

Статистически значимое снижение вагинального pH.

Анализ популяций.

Предназначенная для лечения (Intent-to-Treat (ITT)) популяция будет состоять из подвергаемых лечению субъектов с оценением фона и по меньшей мере одним оценением эффективности после фона. Субъекты, которые получали неправильное лечение, будут анализироваться как рандомизированные. Этот анализ популяции должен рассматриваться как первичный анализ популяции. Субъекты в этой популяции, которые лишены наблюдений после фона, будут иметь эту последнюю величину, продвинутую для анализов эффективности.

Популяция на протокол (PP) состоит из субпопуляции этой обработанной популяции, которая завершает это исследование через временную точку 12 недель без нарушений основного протокола, которые, как считается, нарушают данные эффективности. Главные нарушения протокола будут определяться перед раскрытием слепого исследования, на основе обзора перечней данных и мониторинга сообщений об отклонениях от протокола. Субъекты в PP-популяции должны получать по меньшей мере 90% требуемого количества применений обработки исследования в указанной протоколом продолжительности для этого субъекта, на основе данных дневника этого субъекта. Субъекты в PP-популяции должны точно соблюдать схему окон визитов: ± 3 дня для дня 14 и ± 7 дней для недель 4, 8 и 12. Субъекты, которые получали неправильное лечение, но для которых это получаемое лечение может быть недвусмыс-

ленно подтверждено, будут анализироваться в РР-популяции, как лечившиеся, при условии, что они не имеют других нарушений, которые компрометируют эти данные. РР-популяция будет поддерживающей популяцией для анализа данных эффективности.

Популяция надежности будет определяться как все субъекты, которые получают введение любого тест-изделия (DHEA в любой дозе или плацебо) и которые имеют доступную информацию надежности. Все анализы данных надежности будут основываться на этой популяции. Анализ будет основываться на фактически полученном лечении.

Оценивание эффективности.

Анализ эффективности будут выполняться первично на популяции ИТТ, и популяция Per-Protocol будет обеспечивать поддерживающие анализы эффективности. Целью этого первичного исследования является оценивание реакции доза-ответ параметров слизистой оболочки вагины для локального действия DHEA в постменопаузальных женщинах, страдающих от вагинальной атрофии, в частности, определением минимальной дозы DHEA, которая производит максимальное действие на слизистую оболочку вагины. Этими ко-первичными конечными точками для достижения этой цели являются уменьшение парабазальных клеток, уменьшение вагинального pH, увеличение поверхностных клеток (вместе, эти конечные точки будут называться физиологическими параметрами) и сообщенный самим субъектом наиболее беспокоящий симптом, включающий в себя вагинальную сухость, вагинальный и/или вульварный зуд/раздражение и вагинальную боль, ассоциированную с половой активностью (вместе, эти конечные точки будут называться параметрами-баллами симптома). Кроме этих первичных конечных точек, будет также рассчитываться величина зрелости. Сообщаемые субъектом оценки симптома будут следующими величинами: отсутствие симптома, легкий, умеренный или тяжелый, с использованием при анализе величин 0, 1, 2 или 3, соответственно. Все конечные точки должны демонстрировать статистически значимые эффекты относительно плацебо, и, следовательно, для множественных конечных точек не требуется статистическая коррекция.

Первичной временной точкой для анализа будет 12-недельное оценивание, с дополнительными представлениями данных для 2, 4 и 8 недель. Изменение от фона до оценки после фона будет использоваться для анализа, так же как это различие с плацебо.

Результаты.

Поскольку парабазальные клетки являются обычно преобладающей категорией в вагинальном мазке постменопаузальных женщин, страдающих по меньшей мере от одного умеренного - тяжелого симптома вагинальной атрофии, на фиг. 22 и в табл. 6 можно видеть, что уже при 2 неделях лечения самая низкая доза DHEA (0,25%) уменьшала % парабазальных клеток на $29,5 \pm 0,51\%$ от 56,0 до 26,5%, тогда как уменьшения $37,8 \pm 0,46\%$ и $36,6\%$ наблюдали, соответственно, с дозами 0,5 и 1,0% DHEA при том же самом временном интервале. При стандартной продолжительности 12 недель лечения наблюдали уменьшения $39,5 \pm 0,57\%$ ($p < 0,000001$), $45,6 \pm 0,55\%$ ($p < 0,000001$) и $45,2 \pm 0,53\%$ ($p < 0,000001$) с дозами DHEA 0,25, 0,5 и 1,0% DHEA, соответственно, в то время как не наблюдали значимого действия в группе плацебо при любом временном интервале.

В то время как не наблюдали значимого действия при 12 неделях в группе плацебо на%-ное изменение поверхностных клеток (табл. 6), были измерены увеличения $3,96 \pm 0,10\%$ ($p = 0,0002$), $6,71 \pm 0,14\%$ ($p = 0,00001$) и $5,92 \pm 0,12\%$ ($p = 0,00001$) в группах 0,25, 0,5 и 1,0% DHEA, соответственно. Можно также видеть, что при дозе 0,5% DHEA, 48,0% максимальный эффект достигался при 2 неделях, в то время как при 4 и 8 неделях достигался максимальный эффект 84,8 и 99,0%. При дозе 1,0% DHEA максимальный эффект достигался уже при 2 неделях. Фиг. 23 иллюстрирует абсолютные величины% поверхностных клеток при различных дозах DHEA и временных интервалах.

Вагинальный pH уменьшался при 12 неделях на $0,47 \pm 0,11$ от $6,52 \pm 0,13$ единиц pH в группе плацебо (табл. 6, фиг. 24), в то время как наблюдали уменьшения $1,12 \pm 0,11$ ($p = 0,0005$) от $6,49 \pm 0,12$, $1,35 \pm 0,3$ от $6,56 \pm 0,13$, $1,35 \pm 0,13$ от единиц pH $6,56 \pm 0,13$ единиц pH и $1,39 \pm 0,14$ от $6,34 \pm 0,3$ единиц pH в обработанных 0,25, 0,50 и 1,0% DHEA группах, соответственно (табл. 7). В той же самой таблице можно видеть, что при дозе 0,5% DHEA, максимальное действие на pH 70,6 и 94,1% (уменьшение 1,36 единиц pH) достигалось при 2 и 4 неделях лечения, соответственно. С другой стороны, низкая доза 0,25% DHEA давала только 83,0% максимального действия дозы 0,5% DHEA при 12 неделях. Не наблюдали значимого различия в изменении pH между дозами 0,50 и 1,0% DHEA при 4, 8 и 12 неделях (табл. 7). Фиг. 24 иллюстрирует абсолютные величины pH при различных дозах DHEA и временных интервалах.

Все женщины должны были при вступлении в исследование иметь один или несколько из следующих симптомов вагинальной атрофии, оцениваемых ими самими как умеренные - тяжелые: сухость вагины, вагинальное или вульварное раздражение/зуд или вагинальная боль при половой активности. Самостоятельно идентифицированные женщинами симптомы, сообщаемые как отсутствующие, умеренные или тяжелые, анализировали с использованием величин 0, 1, 2 и 3, соответственно. Как показано в табл. 8, при 12-недельном интервале тяжесть наиболее беспокоящего симптома уменьшалась на $0,67 \pm 0,15$ в группе плацебо, $1,27 \pm 0,16$ в группе 0,25% DHEA ($p = 0,004$ против плацебо), $1,56 \pm 0,15$ в группе, получающей 0,5% DHEA ($p < 0,0001$ против плацебо) и $1,37 \pm 0,14$ в группе, получающей более высокую 1,0%

дозу DHEA ($p=0,0008$ против плацебо). Фиг. 25 иллюстрирует степень участия наиболее беспокоящего симптома при различных дозах DHEA и временных интервалах. Вагинальная сухость, боль, ассоциированная с половой активностью и вагинальное и/или вульварное раздражение/зуд были идентифицированы при фоне как наиболее беспокоящий симптом. В группе плацебо вагинальная сухость составляла % улучшений, отмечаемых участниками.

Как показано на фиг. 25, улучшение этого наиболее беспокоящего симптома было уже с высокой значимостью отличающимся ($p=0,004$) при дозе 0,25% DHEA. Процент женщин с отсутствием изменения или с ухудшением оценки (в баллах) 1 при 12 неделях изменялся от 53,5% в группе плацебо до 27,5, 17,8 и 19,6% в группах 0,25, 0,5 и 1,0%, соответственно (табл. 9). Улучшения на 2 или 3 категории тяжести наблюдали в 21,8% женщин, обработанных плацебо, тогда как 50,0, 53,3 и 47,9% женщин, которые получили 0,25, 0,5 и 1,0% препараты DHEA, сообщали такое важное улучшение.

Только 4,6% женщин обнаруживали уменьшение от тяжелого до отсутствующего в группе плацебо в сравнении с 7,5, 20 и 10,9% в тех же самых обработанных DHEA группах.

При тех же самых временных интервалах 2, 4, 8 и 12 недель, гинеколог или врач, ответственные за это клиническое исследование, в каждой точке исследования выполняли вагинальное обследование для оценивания степени тяжести (отсутствующей, легкой, умеренной или тяжелой, анализируемой с использованием величин 0, 1, 2 и 3, соответственно) на основные признаки вагинальной атрофии, а именно, вагинальные секреты, цвет вагины, целостность эпителия вагины и толщину эпителиальной поверхности вагины. Как можно видеть на фиг. 26-29, наблюдали зависимое от времени и зависящее от дозы, а также высоко статистически значимое улучшение всех четырех симптомов вагинальной атрофии. Действительно, благоприятные действия, наблюдаемые гинекологом или лечащим врачом, являются почти совмещаемыми с этими самостоятельно сообщенными женщинами действиями на их наиболее беспокоящие симптомы, а также с действиями на вагинальные парабазальные и поверхностные клетки и pH, которые являются объективными параметрами действия DHEA.

Фиг. 30 и 31 иллюстрируют средние 24-часовые (рассчитанные из величин $AUC_{0-24ч}$, измеренных в дни 1 и 7 лечения) уровни сывороточных стероидов DHEA и одиннадцати его метаболитов, взятые из недавнего исследования (Labrie, Cusan et al., 2008). Можно видеть, что только сывороточные DHEA и 5-диол (и 4-дион в день 1) увеличиваются значимо, но в пределах границ величин, обнаруживаемых в постменопаузальных женщинах (Labrie, Belanger et al., 2006). Отсутствует значимое действие на сывороточные эстрогены (E_1 , E_2 и E_{11}), а также на сывороточные андрогены (тестостерон и ДГТ).

Таблица 6. Изменение со дня 1 в % парабазальных и поверхностных клеток во время локального лечения увеличивающимися дозами DHEA *

	2 недели	4 недели	8 недель	12 недель
Парабазальные клетки				
0.0% DHEA	+ 3,6 ± 0,32	+ 0,02 ± 0,32	-1,17±0,37	+ 1,04 ±0,35
0.25% "	-29,5 ±0,51	-38,4 ±0,51	- 40,3 ± 0,55	- 39,5 ± 0,57
0.50% "	- 37,8 ± 0,46	- 43,4 ± 0,50	-47,8 ±0,49	- 45,6 ± 0,55
1.0%	- 36,6 ± 0,50	-42,5 ±0,51	- 43,7 ± 0,50	- 45,2 ± 0,53
Поверхностные клетки				
0.0% DHEA	0,10 ±0,03	0,37 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,53 ± 0,05
0.25% "	2,32 ± 0,07	3,38 ± 0,08	3,42 ± 0,09	3,96 ±0,10
0.50% "	3,22 ± 0,05	5,69 ± 0,09	6,64 ±0,11	6,71 ±0,14
1.0%	6,26 ±0,16	6,64 ± 0,14	6,88 ±0,16	5,92 ±0,12

* среднее ±SEM.

Таблица 7. Изменение со дня 1 в вагинальном pH во время локального лечения увеличивающимися дозами DHEA *

Доза DHEA	2 недели	4 недели	8 недель	12 недель
0.0% DHEA	-0,23 ± 0,08	-0,37 ± 0,09	-0,51 ±0,10	-0,47 ±0,11
0.25% "	-0,76 ±0,12	-0,93 ± 0,12	-1,09 ±0,10	-1,12 ± 0,11
0.50% "	-0,96 ± 0,14	-1,28 ± 0,12	-1,36 ± 0,12	-1,35 ±0,13
1.0%	-1,13 ±0,12	-1,30 ±0,12	-1,41 ±0,12	-1,39 ±0,14

* среднее ±SEM.

Таблица 8. Изменение со дня 1 в наиболее беспокоящих симптомах вагинальной атрофии во время локального лечения увеличивающимися дозами DHEA*

Доза DHEA	2 недели	4 недели	8 недель	12 недель
0.0% DHEA	-0,49 ±0,16	-0,79 ±0,16	-0,61 ±0,16	-0,67 ±0,15
0.25% "	-0,70 ±0,17	-1,11 ±0,16	-1,19 ± 0,16	-1,27 ±0,16
0.50% "	-0,98 ±0,15	-1,36 ±0,15	-1,37 ±0,17	-1,56 ±0,15
1.0%	-1,00 ±0,15	-1,29 ±0,14	-1,38 ±0,17	-1,37 ±0,14

* среднее ±SEM.

Таблица 9. Изменение со дня 1 в наиболее беспокоящих симптомах при 12 неделях лечения 0 (плацебо), 0,25, 0,50 и 1,0% DHEA.

Изменение категории	-3	-2	-1	0	+ 1
Дозы	% женщин				
0.0% DHEA	4,65	16,3	25,6	48,8	4,65
0.25% "	7,50	42,5	22,5	25,0	2,50
0.50% "	20,0	33,3	28,9	17,8	0,0
1.0% "	10,9	37,0	32,6	17,4	2,17

* среднее ±SEM.

Изменение от одной категории (тяжелая→умеренная→легкая→отсутствующая) берется за -1, тогда как изменение на 2 категории было равно -2, и т.д.

Примеры фармацевтических композиций.

Ниже представлены, в качестве примера, а не в качестве ограничения, несколько фармацевтических композиций, использующих предпочтительный предшественник активных половых стероидных гормонов DHEA. Концентрация активного ингредиента может варьироваться на протяжении большого диапазона, как обсуждалось здесь. Количества и типы других ингредиентов, которые могут быть включены, хорошо известны в данной области.

Пример А. Вагинальная или пероральная таблетка

Ингредиент	Масса в % (в расчете на массу всей композиции)
DHEA	5,0
Желатин	6,5
Лактоза	70,5
Крахмал	18,0

Пример В. 1,3 мл - Вагинальный суппозиторий.

Ингредиент	Масса в % (в расчете на массу всей композиции)
DHEA	0,50
Whitepsol H-15 base	99,50

Суппозитории DHEA готовили с использованием в качестве основы Whitepsol H-15 base (доступно из Medisca, Montreal, Canada). Может быть использована любая другая липофильная основа, такая как, но не только, масло, какао-масло, Cotomar, Dehydag Base, Fattibase, Hexarcde Base 95, Hydrokote, Suppocire, Wecobee, масло какао, Japocire, Ovucire, Massa Estarinum или другие комбинации предыдущих компонентов.

Пример С. Вагинальный или наносимый локально крем

Ингредиент	Масса в % (в расчете на массу всей композиции)
DHEA	1.0
Эмульгирующий воск	18.0
Легкое минеральное масло	12.0
Бензиловый спирт	1.0
Этанол 95% USP	34.0
Очищенная вода, USP	34.0

Вагинальная или пероральная желатиновая капсула.

Другие предшественники половых стероидных гормонов могут быть использованы вместо DHEA в вышеуказанных препаратах. Могут быть включены несколько предшественников, причем в этом случае комбинарованным мас.% является предпочтительно мас.% для отдельного предшественника, указанный в приведенных выше примерах.

Это изобретение было описано в виде предпочтительных вариантов осуществления и примеров, но не ограничивается ими. Квалифицированным в данной области специалистам будут понятны более широкая применимость и объем этого изобретения, который ограничивается только приведенной далее формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

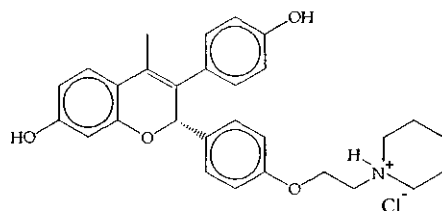
1. Способ лечения или предотвращения у женщин в постменопаузе, которые не принимают прогестин и/или эстроген, симптомов или заболеваний, выбранных из группы, состоящей из вагинальной атрофии, гипогонадизма, кожной атрофии, коллагеноза, недержания мочи, вазомоторных симптомов, приливов, инсулинорезистентности, усталости, потери энергии, включающий введение:

а) терапевтического количества предшественника половых стероидных гормонов, выбранного из группы, состоящей из дегидроэпиандростерона, сульфата дегидроэпиандростерона, андрост-5-ен-3 β ,17 β -диола и 4-андростен-3,17-диона, которое увеличивает уровень циркулирующих в кровотоке метаболитов андрогенов, при условии, что терапевтически эффективное количество составляет 25, 50 или 100 мг/день при интравагинальном введении, 15-200 мг/день при введении путем нанесения на кожу, 10-200 мг/день при пероральном введении или 1,0-25 мг/день при парентеральном введении, и

б) введение терапевтически эффективного количества селективного модулятора эстрогеновых рецепторов.

2. Способ по п.1, где селективный модулятор рецептора эстрогена имеет следующую химическую структуру:

Аколбифен (EM-652·HCl; EM-1538)



3. Способ по п.1, где симптомы или заболевания вследствие менопаузы выбраны из группы заболеваний, состоящей из вагинальной атрофии, недержания мочи, вазомоторных симптомов и приливов.

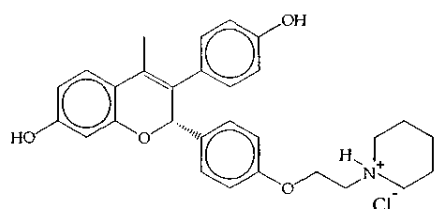
4. Способ лечения или предотвращения вагинальных заболеваний или симптомов у женщин в постменопаузе, которые не получают прогестин и/или эстроген, выбранных из группы, состоящей из вагинального зуда, вагинальной атрофии, атопического вагинита, диспареунии, вагинального кровотечения при половой активности, потери компактности коллагеновых волокон вагинальной стенки и низкой толщины мышечной пластинки слизистой оболочки вагинальной стенки у пациента, включающий введение:

а) терапевтически эффективного количества предшественника половых стероидных гормонов, выбранного из группы, состоящей из дегидроэпиандростерона, сульфата дегидроэпиандростерона, андрост-5-ен-3 β ,17 β -диола и 4-андростен-3,17-диона, которое увеличивает уровень циркулирующих в кровотоке метаболитов андрогена, при условии, что терапевтически эффективное количество составляет 25, 50 или 100 мг/день при интравагинальном введении, 15-200 мг/день при введении путем нанесения на кожу, 10-200 мг/день при пероральном введении или 1,0-25 мг/день при парентеральном введении, и

б) введение терапевтически эффективного количества селективного модулятора рецепторов эстрогена.

5. Способ по п.4, где селективный модулятор рецептора эстрогена имеет следующую химическую структуру:

Аколбифен (EM-652·HCl; EM-1538)



6. Способ по п.4, где вагинальные заболевания выбраны из группы заболеваний, состоящей из вагинального зуда, вагинальной атрофии, атопического вагинита и диспареунии.

7. Способ по п.1 или 4, где предшественник половых стероидных гормонов вводят путем нанесения на кожу.

8. Способ по п.1 или 4, где предшественник половых стероидных гормонов вводят интравагинально.

9. Способ по п.1 или 4, где предшественник половых стероидных гормонов вводят перорально.

10. Способ по п.7 или 9, где терапевтическое количество предшественника половых стероидных гормонов составляет 10-100 мг в день при пероральном введении или 15-100 мг в день при введении путем нанесения на кожу.

11. Способ по п.7 или 9, где терапевтическое количество предшественника половых стероидных гормонов составляет 10-50 мг в день при пероральном введении или 15-50 мг в день при введении путем нанесения на кожу.

12. Способ по п.7 или 9, где терапевтическое количество предшественника половых стероидных гормонов составляет 10-25 мг в день при пероральном введении или 15-25 мг в день при введении путем нанесения на кожу.

13. Способ по п.7, где терапевтическое количество предшественника половых стероидных гормонов вводят посредством препарата для местного введения, выбранного из группы, состоящей из крема, лосьона, геля, мази или пластыря пролонгированного высвобождения, и указанный препарат содержит 10% или менее предшественника половых стероидных гормонов.

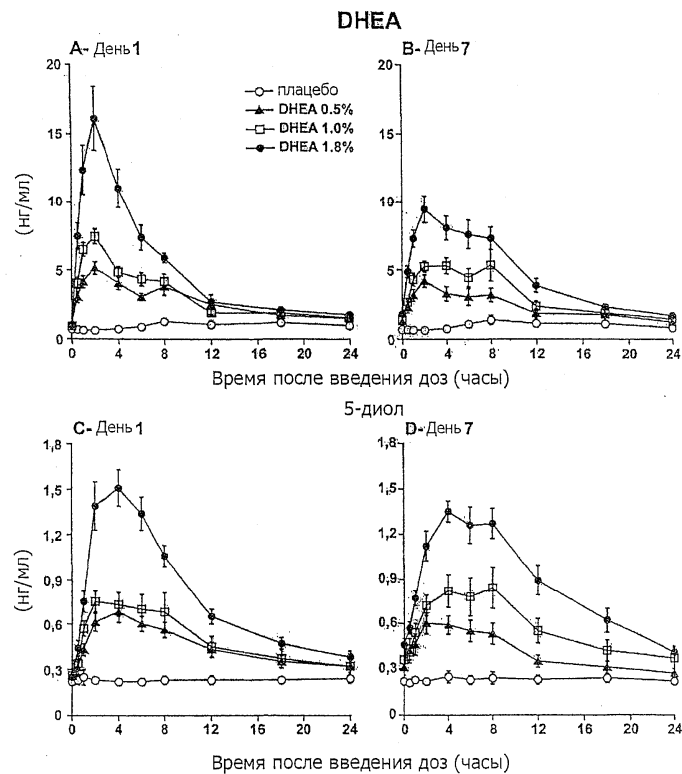
14. Способ по п.7, где терапевтическое количество предшественника половых стероидных гормонов вводят посредством препарата для местного введения, выбранного из группы, состоящей из крема, лосьона, геля, мази или пластыря пролонгированного высвобождения, и указанный препарат содержит 2,0% или менее предшественника половых стероидных гормонов.

15. Способ по п.8, где терапевтическое количество предшественника половых стероидных гормонов вводят посредством интравагинального препарата, выбранного из группы, состоящей из крема, лосьона, геля, влажной овулы, суппозитория или кольца, и указанный препарат содержит 10% или менее предшественника половых стероидных гормонов.

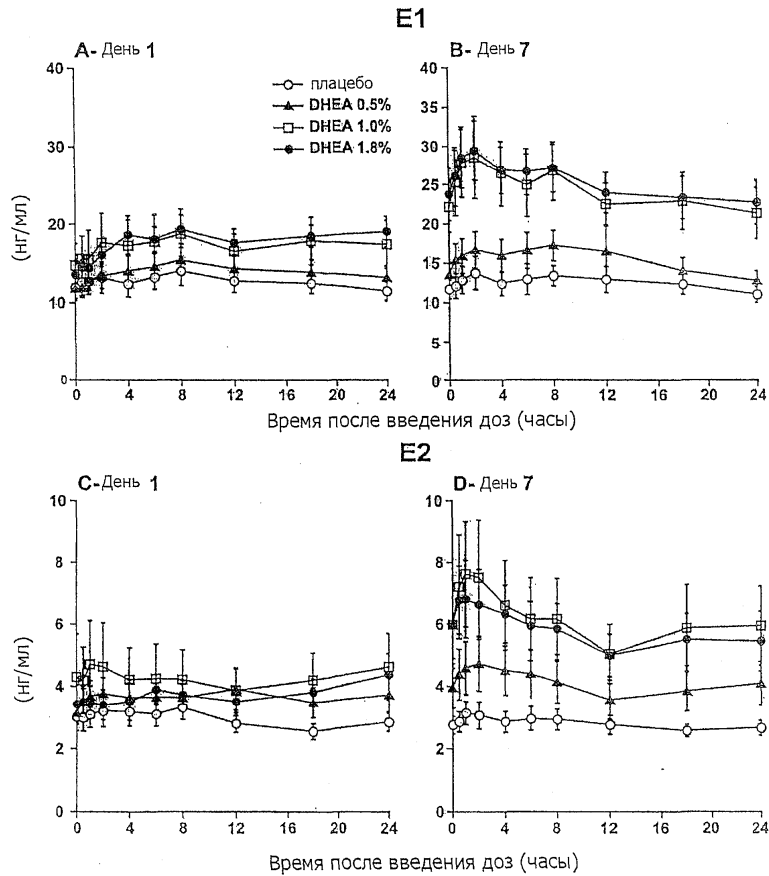
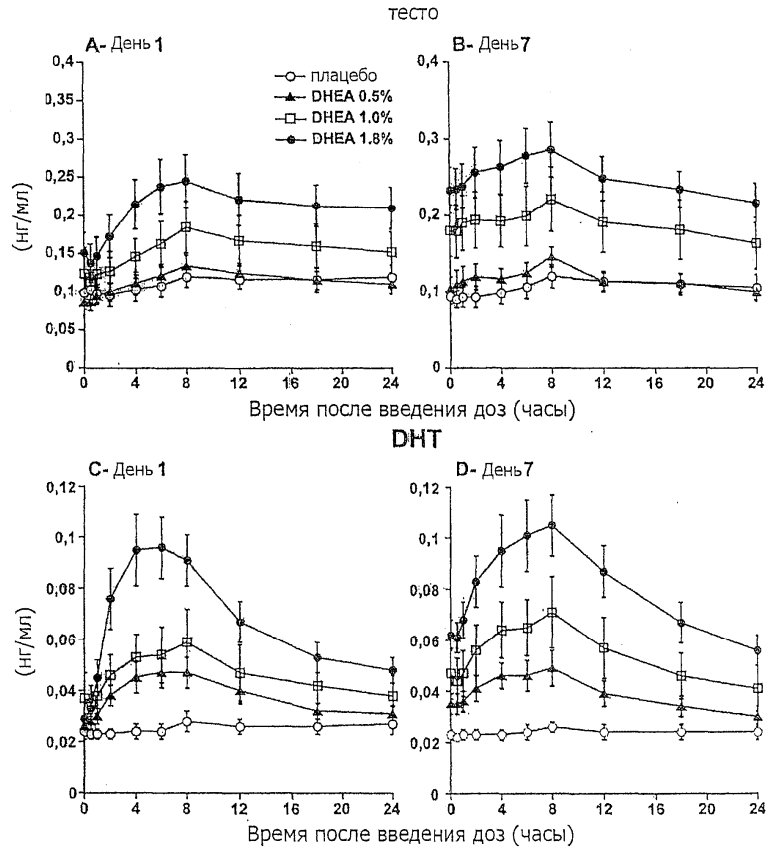
16. Способ по п.8, где терапевтическое количество предшественника половых стероидных гормонов вводят посредством интравагинального препарата, выбранного из группы, состоящей из крема, лосьона, геля, влажной овулы, суппозитория или кольца, и указанный препарат содержит 2,0% или менее предшественника половых стероидных гормонов.

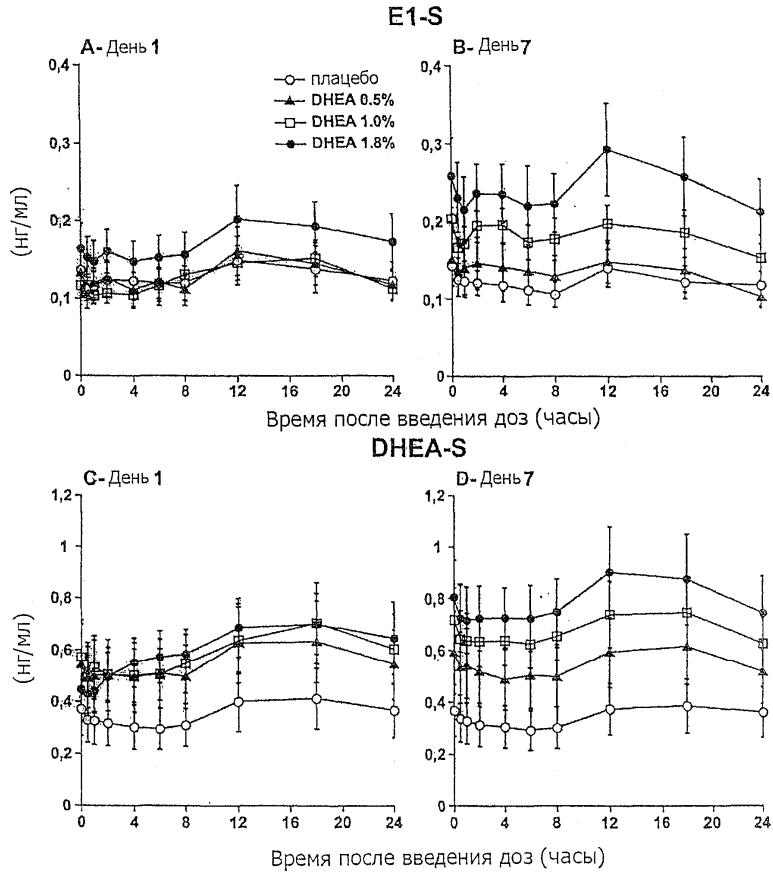
17. Способ по п.9, где терапевтическое количество предшественника половых стероидных гормонов вводят посредством перорального препарата, выбранного из группы, состоящей из капсул, капсул с пробками, пилюль, таблеток или сиропов.

18. Способ по любому из пп.1-17, где предшественником полового стероидного гормона является дегидроэпиандростерон.



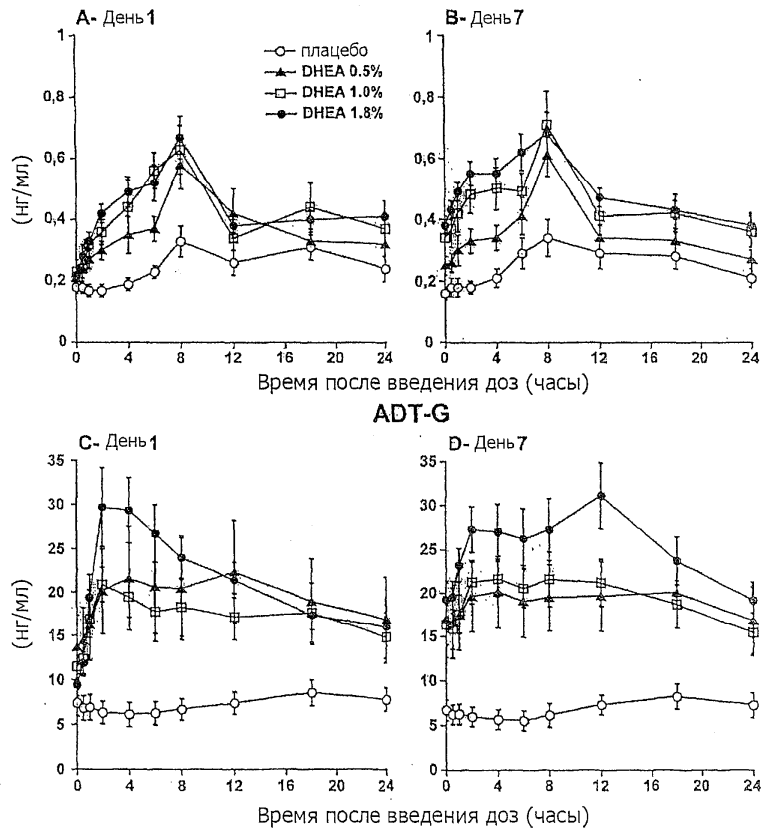
Фиг. 1



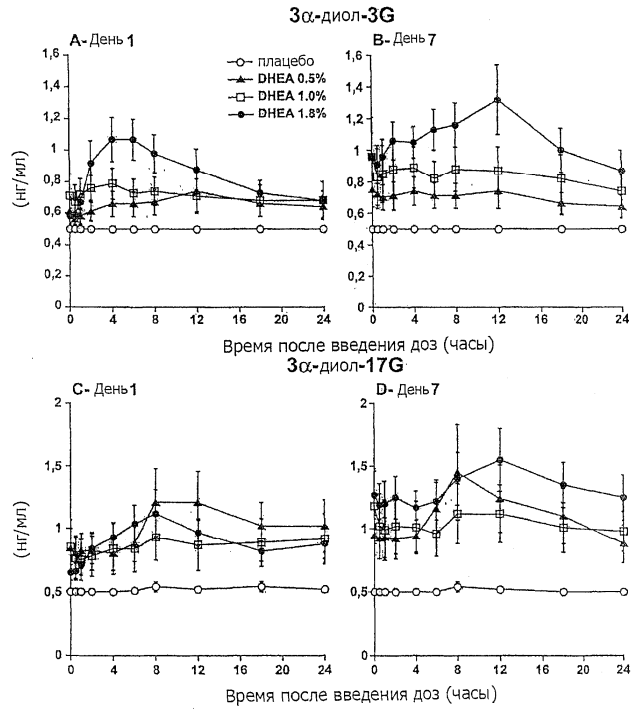


Фиг. 4

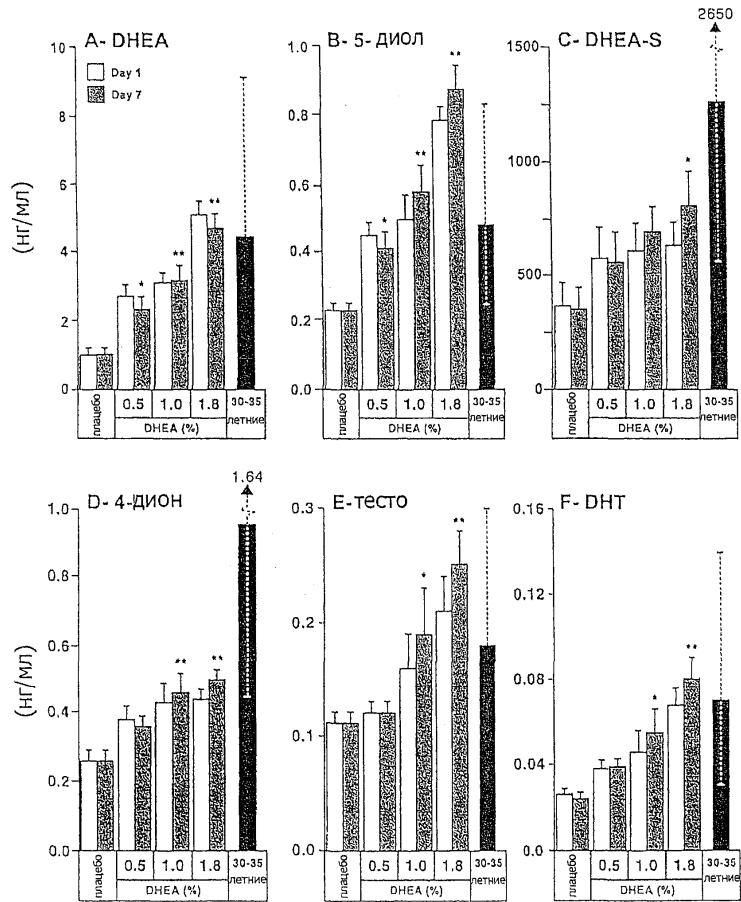
4-дион



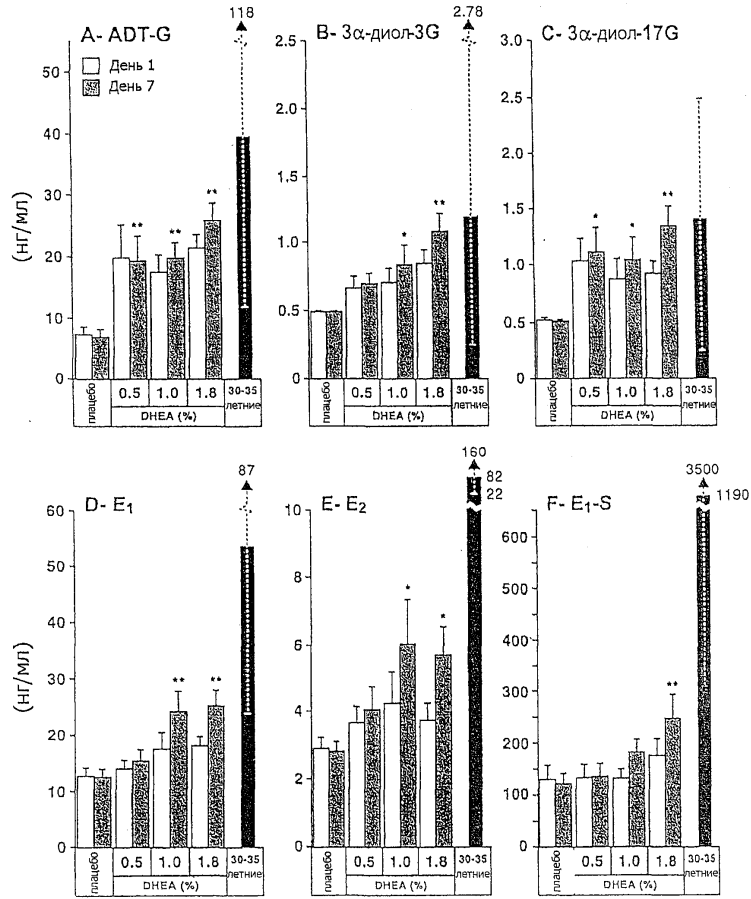
Фиг. 5



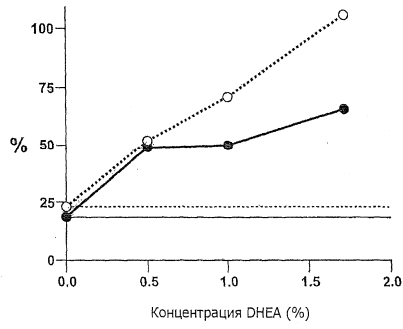
Фиг. 6



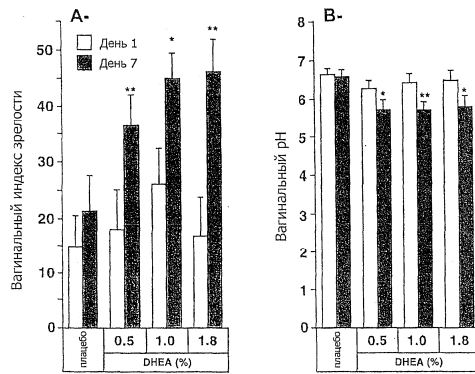
Фиг. 7



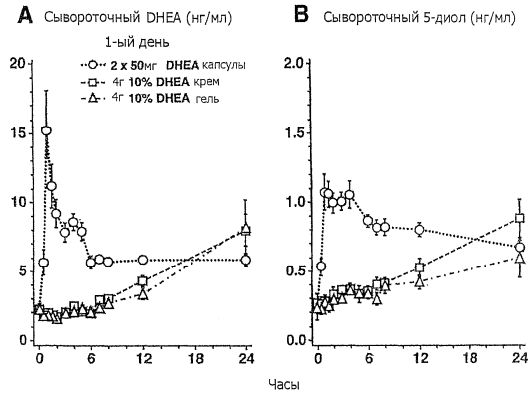
Фиг. 8



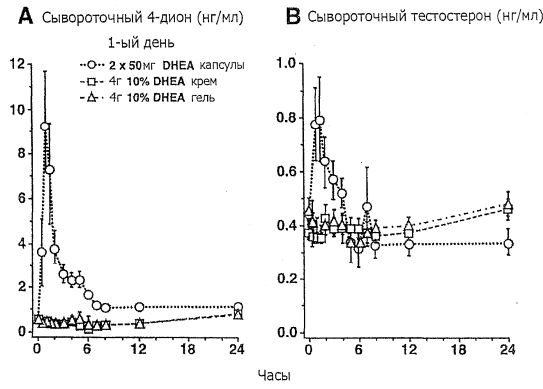
Фиг. 9



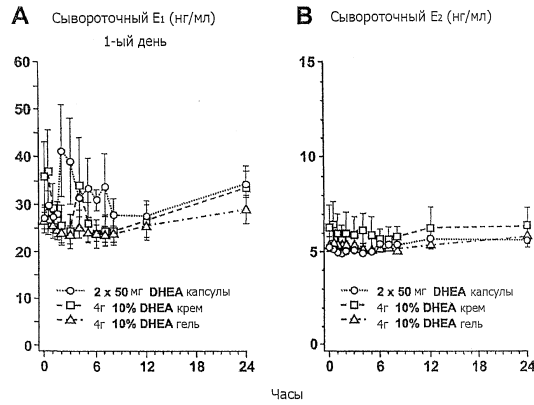
Фиг. 10



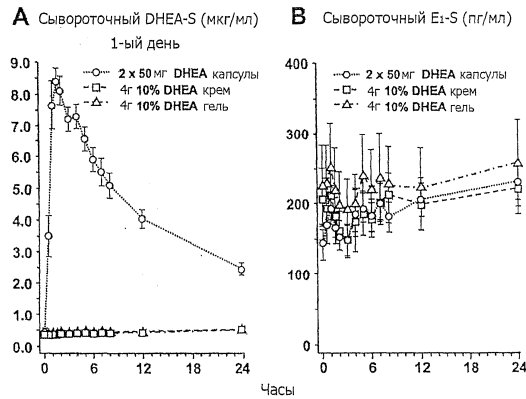
Фиг. 11



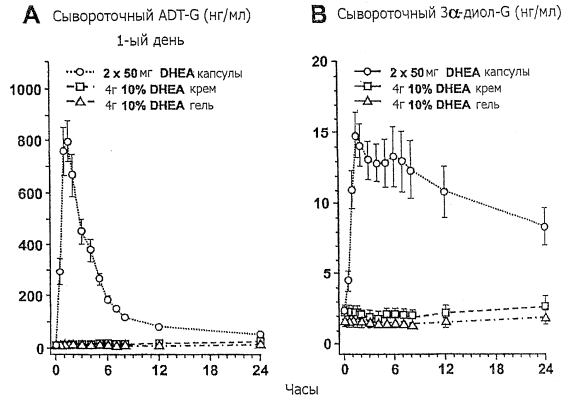
Фиг. 12



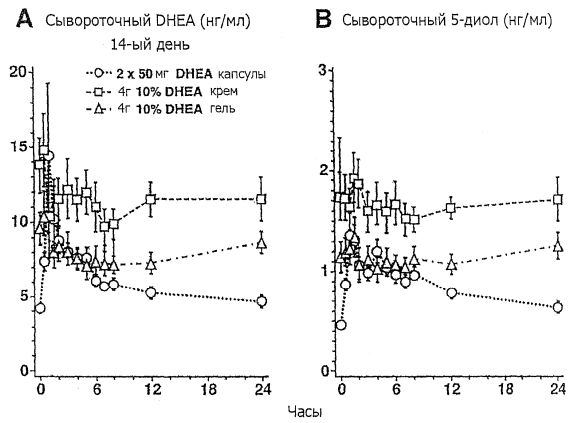
Фиг. 13



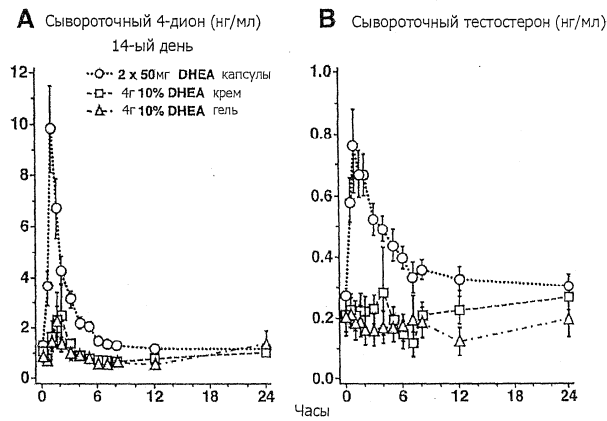
Фиг. 14



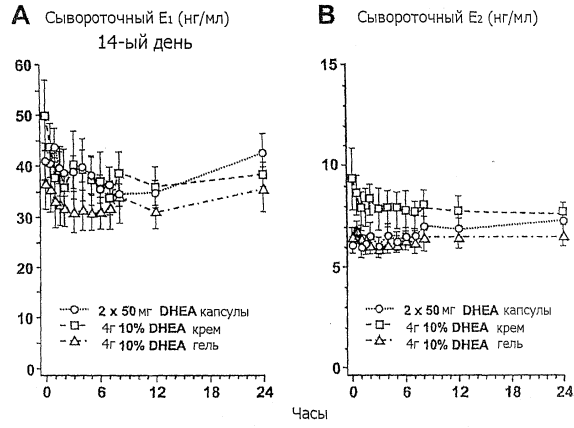
Фиг. 15



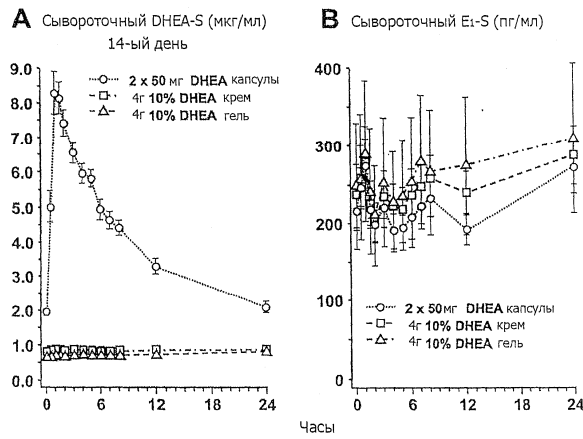
Фиг. 16



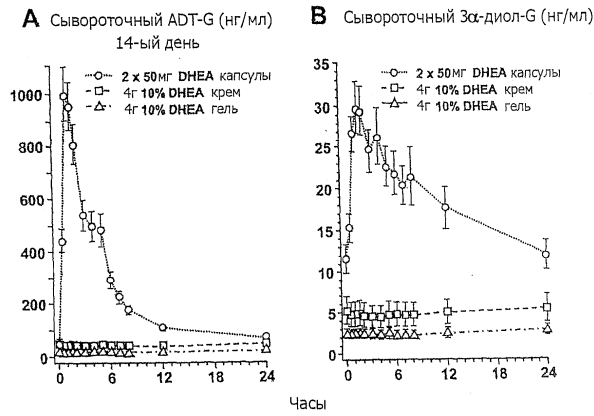
Фиг. 17



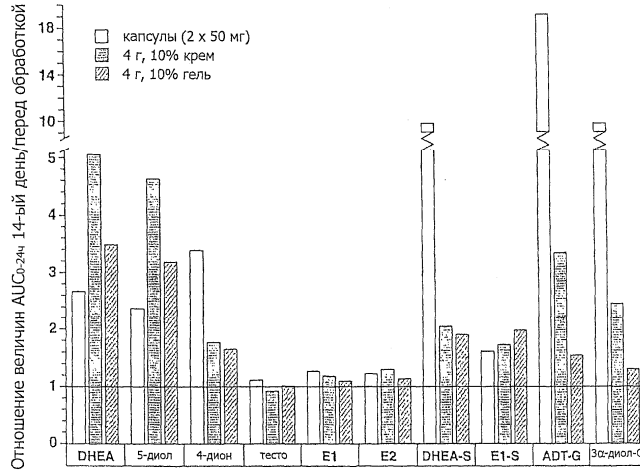
Фиг. 18



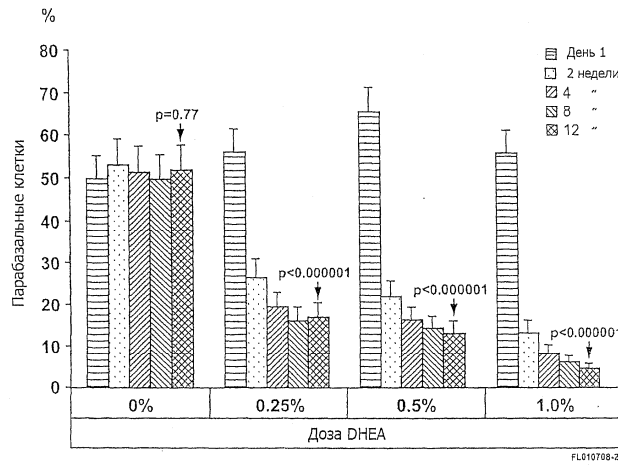
Фиг. 19



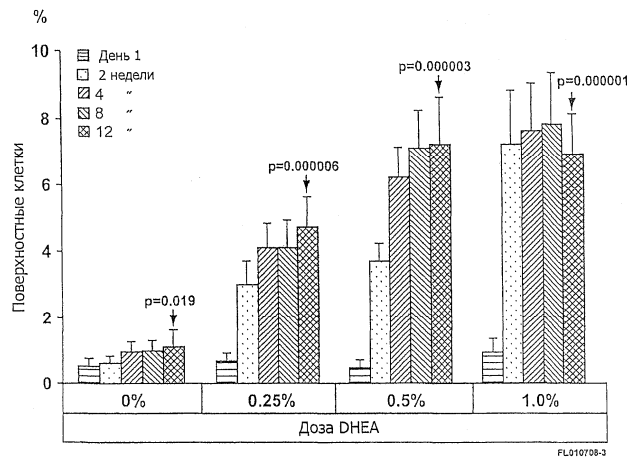
Фиг. 20



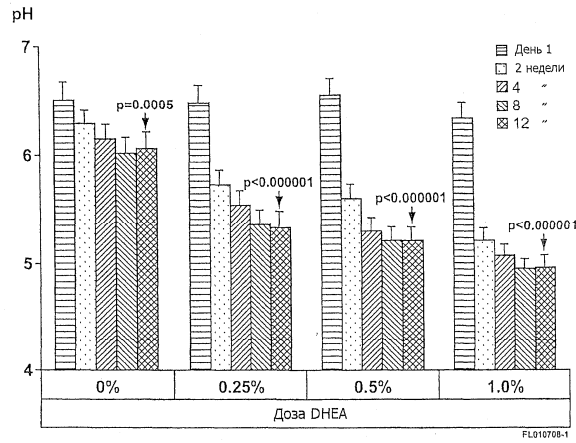
Фиг. 21



Фиг. 22

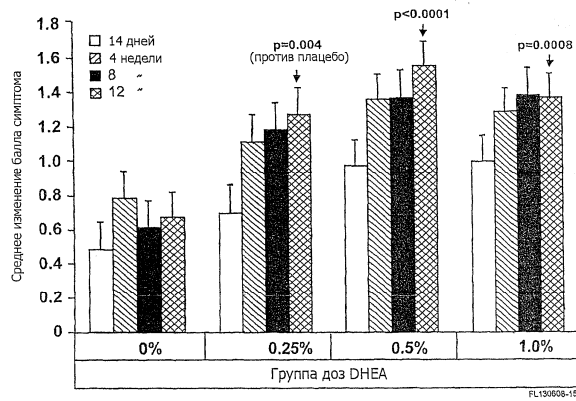


Фиг. 23



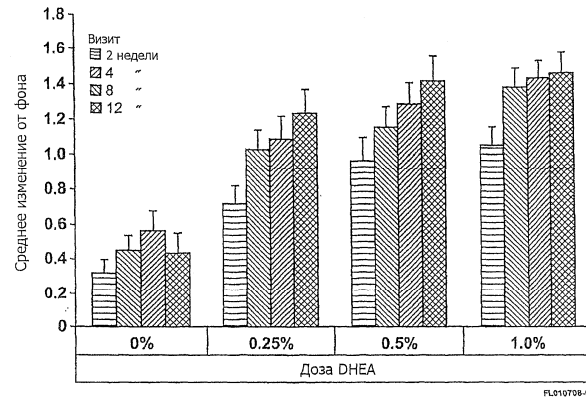
Фиг. 24

Среднее изменение от фона (День 1) посредством обработки в наиболее беспокоящем симптоме

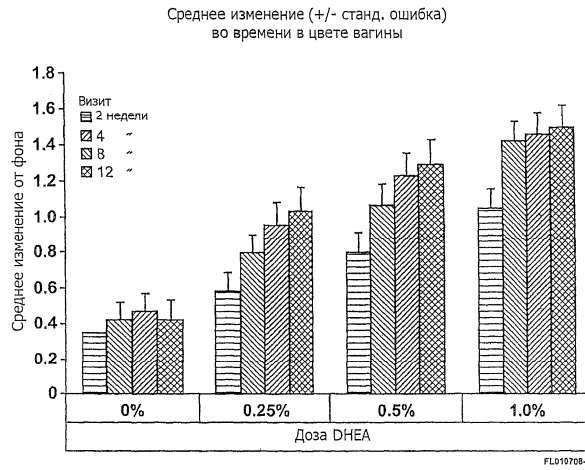


Фиг. 25

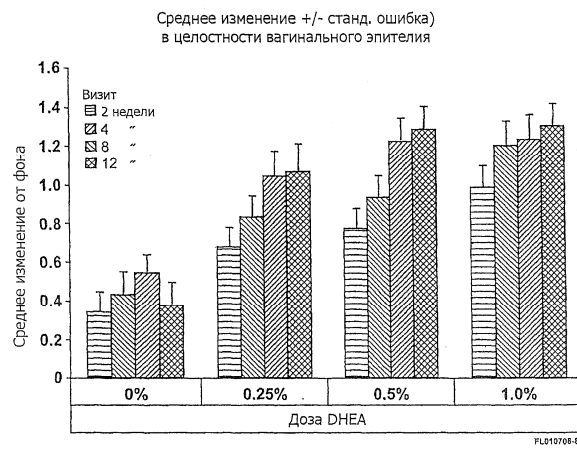
Среднее изменение (+/- станд. ошибка) посредством обработки в вагинальных секретах



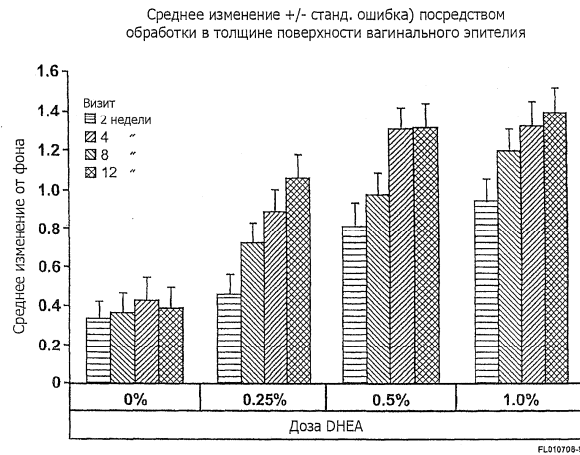
Фиг. 26



Фиг. 27

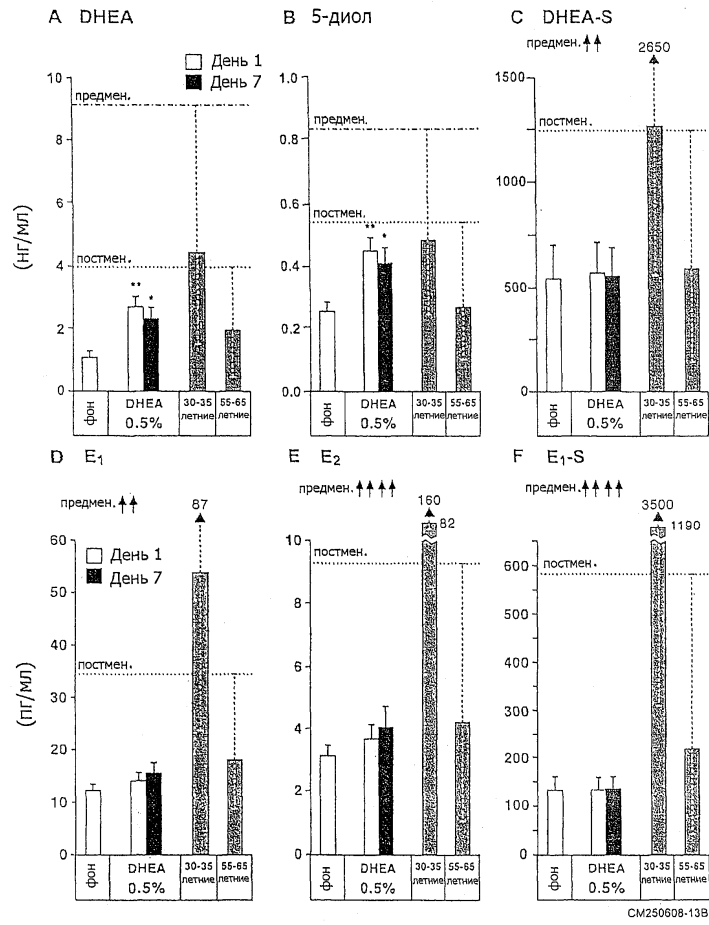


Фиг. 28



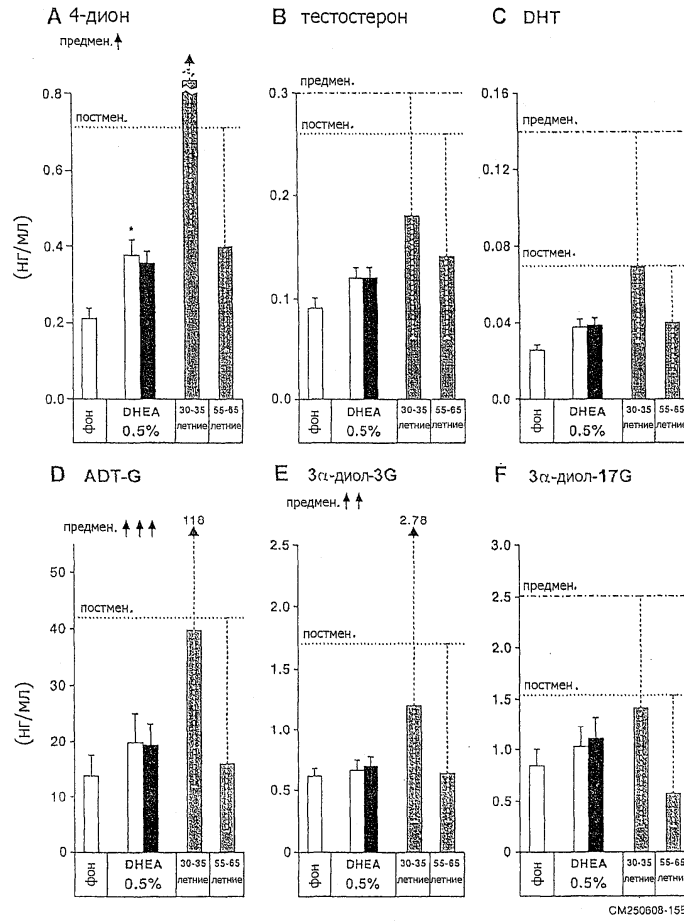
Фиг. 29

Средние 24-часовые уровни сывороточных стероидов



Фиг. 30

Средние 24-часовые уровни сывороточных стероидов



Фиг. 31

