

Innovation you can build on™

Procapil™



Deutsch

sederma

PROCAPIL™

SEDERMA Patents: FR 2 791 684;
WO 00/58347; RD 479 016;

Für eine bessere Verankerung der Haare:
Matrikin und Phyto-regulatoren



Jede Verwendung dieses Dossiers für kommerzielle und Werbezwecke bedarf der vorherigen Genehmigung der Firma SEDERMA.

Non- Warranty: The information in this publication is given in good faith by Sederma by way of general guidance and for reference purposes only. The information should not be construed as granting a license to practice any methods or compositions of matter covered by patents. Sederma assumes no liability in relation to the information and gives no warranty regarding the suitability of the product and/or ingredients described for a particular use. The use made of the product and/or ingredients described by the recipient and any claims or representations made by the recipient in respect of such product and/or ingredients are the responsibility of the recipient. The recipient is solely responsible for ensuring that products marketed to consumers comply with all relevant laws and regulations.

PROCAPIL™

ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG

Beschreibung: Kombination von 3 sich ergänzenden Wirkstoffen in Lösung

INCI- Bezeichnung: Butylene Glycol (and) Water (Aqua) (and) PPG-26-Buteth-26 (and) PEG-40 Hydrogenated Castor Oil (and) Apigenin (and) Oleanolic Acid (and) Biotinoyl Tripeptide-1

Erwiesene kosmetische Wirkung :

- In vitro Studien:
 - Studie zur Wirksamkeit des Peptids Biotinyl-GHK auf den Haarfollikel (Studie durchgeführt von BIOALTERNATIVES)
 - Anti-Aging-Studie an den in Nährmedium aufbewahrten Haarfollikeln (Studie durchgeführt von BIO-EC):
In Gegenwart von 2 ppm Biotinyl-GHK (d.h. 1% **PROCAPIL™**) wird ein gegenüber der Kontrolle um +58% stärkeres Wachstum beobachtet, das dem Wachstum in Gegenwart von 2ppm (10µM) Minoxidil® entspricht. Bei 5ppm Biotinyl-GHK (d.h. 2,5% **PROCAPIL™**) ist das Wachstum +121% größer als bei der Kontrolle.
 - Genaktivierung durch **PROCAPIL™** (DNA-Array) (Studie durchgeführt von BIOALTERNATIVES)
- In vivo Studien:
Placebo-kontrollierte klinische Studie über 4 Monate
(Studie durchgeführt von Laboratoires DERMSCAN).
Die Ergebnisse der klinischen Studie, deren 4-monatige Dauer einem Zyklus des Telogenstadiums (Ruhestadiums) entspricht, zeigen eine signifikante Verbesserung des Verhältnisses Anagen-zu Telogenstadium der Haare ($p < 0,05$) in der mit **PROCAPIL™** behandelten Gruppe.

Empfohlene Einsatzkonzentration: 3%

Unbedenklichkeit: im Rahmen der UNITIS-Charta zertifiziert

Tests auf Anfrage :



Sachverständigenbericht

Test HET CAM

Patch-Test beim Menschen

RIPT

AMES-Test

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	S.1 - 7/41
2.	DAS KONZEPT VON SEDERMA ZUR VERZÖGERUNG DES HAARAUSFALLS	S.8 - 9/41
3.	WIRKSAMKEITSSTUDIEN	S.10 - 35/41
	3.1. <i>In vitro</i> -Studien	
	3.1.1. Studie an Haarfollikel-Explantaten in Kulturmedium (Substantivität des Peptids Biotinyl-GHK gegenüber dem Haarfollikel (Studie durchgeführt von BIOALTERNATIVES))	
	3.1.2. Anti-Aging-Studie an Haarfollikeln in Kultur (Studie durchgeführt von BIO-EC)	
	3.1.3. Genaktivierung durch PROCAPIL™ (Studie durchgeführt von BIOALTERNATIVES)	
	3.2. <i>In vivo</i> -Studie : Placebo-kontrollierte klinische Studie über 4 Monate (Studie durchgeführt von Laboratoires DERMSCAN)	
4.	SCHLUSSFOLGERUNG	S.36 - 37/41
5.	LITERATUR	S.38 - 40/41
	ANHANG	S. 41/41

12/2009/V2

1. EINLEITUNG

Ein nicht unerheblicher Teil der männlichen Bevölkerung sieht sich täglich mit dem Problem abnehmender Haardichte konfrontiert. Morgen für Morgen wird das Haar lichter, bis sich einem schließlich der Anblick einer kahlen Stirn bietet. Zuerst ist man besorgt, dann enttäuscht, und schließlich findet man sich resigniert mit einem wenig attraktiven Äußeren ab, mit einer Kahlheit, die nach und nach den ganzen Kopf mit Ausnahme des Hinterkopfes betrifft.

20% der Männer sind ab dem 20. Lebensjahr von Alopezie betroffen. Mit jedem Lebensjahrzehnt steigt dieser Anteil um 10%, d.h. ab dem 50. Lebensjahr sind die Hälfte aller Männer davon betroffen.

Daher ist es verständlich, dass die Männer diesem Bereich der Kosmetik eine große Bedeutung beimessen.

Die anfangs noch wenig ausgeprägten Alopezien können bereits beim jungen Erwachsenen auftreten und sind in 95% der Fälle androgenetischen Ursprungs.

400 Jahre vor unserer Zeitrechnung beobachtete bereits Hippokrates, dass die jungen Eunuchen niemals kahl wurden, womit er feststellte, dass die Kahlheit von einem spezifisch männlichen Faktor abhängt.

Dieses von der Männlichkeit abhängende Phänomen erklärt auch, warum Frauen weniger häufig von Alopezien betroffen sind. Bei Frauen tritt diese Störung nur in Ausnahmefällen auf, wie z.B. Krankheit, Stress oder manchmal in der Zeit der Menopause, wenn durch die Abnahme der Östrogene die im Blut zirkulierenden Testosterone nicht mehr ausgeglichen werden.

Diese Ungleichheit zwischen Männern und Frauen verschont die letzteren, von denen weniger als 1% über einen übermäßigen Haarausfall oder eine regelrechte Kahlheit klagt.

Es gibt einen weiteren Unterschied zugunsten des weiblichen Haares : es hat eine deutlich längere Lebensdauer, mitunter bis zu 7 Jahre, d.h. eine durchschnittlich doppelt so lange Lebensdauer wie die des männlichen Haares. Dies zeigt sich auch an der Länge, die das Haar bei manchen Frauen erreicht.

Allerdings läuft das Haarwachstum bei beiden Geschlechtern in gleicher Weise in 3 Phasen ab.

Jedes Haar bildet sich in einer von einer Haarzwiebel umgebenen Haarpapille, aus der durch Zellteilung der Keratinozyten das eigentliche Haar wächst.

Jede Haarpapille folgt sozusagen einer "inneren Uhr" und erhält einen Wachstumsimpuls, durch den der natürliche Erneuerungszyklus der Haare ausgelöst wird.

- Die erste Phase ist das Wachstums- oder **Anagenstadium** und dauert etwa 3 bis 4 Jahre.
- Die zweite Phase entspricht dem Wachstumsstopp, dauert etwa 2 bis 3 Wochen, und wird Übergangs- oder **Katagenstadium** genannt.
- Die dritte Phase ist das Ruhe- oder **Telogenstadium** und entspricht dem Haarausfall. Dieser erfolgt ziemlich langsam, da sich dafür die Haarzwiebel zurückbilden und der Haarschaft, der sich in ca. 1,5 mm Tiefe unter der Haut befindet, lösen muss, bevor das Haar zur Hautoberfläche hin abgestoßen wird. Diese Phase dauert etwa 3 bis 4 Monate.

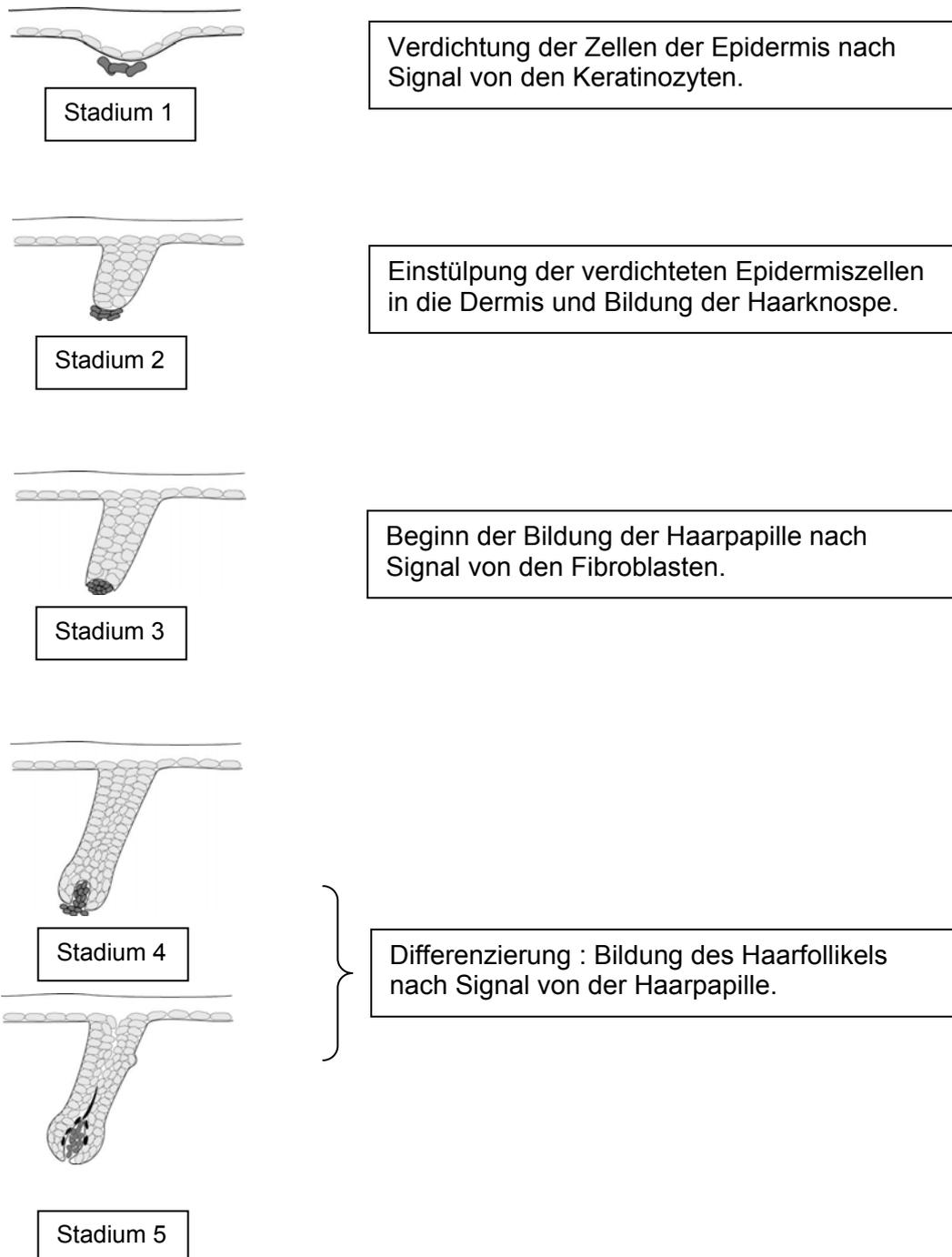
Im Laufe des Lebens wiederholt sich dieser Zyklus ungefähr 25 Mal.

▪ MORPHOGENESE DES HAARES

Körper- und Kopfhaare entstehen aus der Interaktion zwischen Dermis und Epidermis. Auf ein von der Epidermis ausgehendes Signal hin organisieren sich die Fibroblasten und geben ihrerseits den Keratinozyten ein Signal, das an bestimmten Stellen die Verdichtung der Zellen der Epidermis (1) auslöst. Diese Zellen stülpen sich dann in die Dermis ein, um die Haarknospe zu bilden (2).

Die Haarknospe sendet wiederum Signale aus, die die Fibroblasten stabilisieren, um die zukünftige Haarpapille zu bilden (3). Schließlich findet unter den von der Haarpapille ausgehenden Signalen eine progressive Differenzierung der Haarpapille zum Haarfollikel statt (4 und 5).

Die verschiedenen Stadien der Morphogenese des Haares, PAUS 1999



In diesem Dialog zwischen Dermis und Epidermis spielen zahlreiche Botenstoffe eine Rolle, deren genaue Aufgabe noch zu klären ist.

- **HAAR UND EXTRAZELLULÄRE MATRIX**

Ein wesentliches Element des Haarwachstums ist die physikalische Interaktion zwischen Dermis und Epidermis in der Haarpapille, wo sich Keratinozyten und Fibroblasten in kondensiertem Zustand befinden.

Die Haarpapille ist besonders reich an Kollagen und Glykosaminoglykanen, die den Kontakt zwischen diesen beiden Zellpopulationen aufrecht erhalten und die für das Wachstum des Haarschafts erforderliche chemische Kommunikation gewährleisten. Besonders hervorzuheben ist dabei die Bedeutung von Kollagen IV und Laminin, da diese Bestandteile der Matrix sowohl die Basalmembran am Übergang von Dermis zu Epidermis bilden als auch den Hauptteil der Haarpapille (zusammen mit Fibronectin). Sie sind eine Art Motor der Matrix für das Haarwachstum (JAHODA et al, 1992, ALMOND-ROESLER B. et al, 1997).

Die zentrale Rolle, die diese verbindenden Makromoleküle der Matrix beim Wachstum und bei der Differenzierung der Haut und der Hautanhangsgebilde spielen, wurde gut in den Arbeiten von TAMIOLAKIS (2001) zur Embryogenese der menschlichen Haut beschrieben.

Tatsächlich zeigt eine zwischen der 12. und der 21. Woche durchgeführte Immunofluoreszenzmarkierung eine starke Anhäufung von Laminin, Kollagen IV und Fibronectin in der Epithelialscheide des Haarschafts.

Diese Bestandteile, die ursprünglich in den Keimzellen der Haarzwiebel (12. Woche) vorliegen, dringen langsam in die Epithelialscheide des Haarschafts ein, von wo sie bis zur Austrittsstelle des Haares und dem Übergang zwischen Dermis und Epidermis wandern (dermo-epidermale Verbindungsschicht in der 21. Woche).

Im Anfangsstadium vor der 12. Woche läßt sich auch an der Basalschicht zwischen Epidermis und Dermis das Vorhandensein von Vimentin und die Bildung der ersten Hemidesmosomen (8 - 9 Woche) beobachten.

Die Bedeutung dieser Matrixbestandteile für das Überleben und das Wachstum des menschlichen Haarfollikels in Kultur wurde ebenfalls von WARREN R. et al, 1992 nachgewiesen.

Die Rolle dieser verbindenden Matrixproteine lässt sich besonders gut am Ablauf der Ereignisse erkennen, die zur Bildung des neuen Haares führen. Wurde die Haarzwiebel künstlich entfernt, wandern die Keratinozyten an der Außenseite der Epithelialscheide unter die verletzte Stelle und ordnen sich gegenüber den Fibroblasten neu an. An dieser neuen Verbindungsstelle bildet sich eine Matrix aus Kollagen IV, Laminin 5 und Fibronektin : es hat sich eine neue Haarpapille gebildet, die funktionsfähig ist (COLIN et al, 1992).

Es muß darauf hingewiesen werden, dass Kollagen IV und Laminin 5 in erster Linie von den Keratinozyten synthetisiert werden, und dass Laminin 5 eine entscheidende und unersetzliche Rolle beim Zusammenhalt von Dermis und Epidermis sowie bei der Migration der Keratinozyten bei der Wundheilung spielt (ROUSSELLE P., 2003).

▪ HAAR UND MANGELZUSTÄNDE

Biotin oder Vitamin H ist ein essentielles Vitamin, das dem Organismus über die Nahrung zugeführt wird.

Ein Mangel an Biotin drückt sich in Anomalien der Haut und deren Anhangsgebilde aus : feine, unkämmbare Haare (SHELLEY et al, 1985), Alopezie, Schuppen, Juckreiz und Dermatitis (FRIGG et al 1989, FRITSCHÉ et al 1991).

Zu den Zellen, die am empfindlichsten auf einen Mangel an Biotin reagieren, gehören die Nervenzellen und die Keratinozyten (SUORMALA et al, 2002). Mangelzustände beim Menschen äußern sich in einer Verbindung von geistiger Retardierung und Hautanomalien, was nicht weiter verwundert, wenn man den gemeinsamen embryonalen Ursprung von Haut und Gehirn bedenkt.

Biotin reguliert in der Epidermis vor allem die Bildung von spät auftretenden, für die Differenzierung erforderlichen Zytokeratinen (FRITSCHÉ et al, 1991).

Aus biochemischer Sicht ist Biotin ein enzymatischer Kofaktor, der für das gute Funktionieren der mitochondrialen Carboxylasen, deren prosthetische Gruppe es bildet, unverzichtbar ist.

Es ist kovalent an die Lysinreste der mitochondrialen Enzyme (Pyruvat, Propionyl-CoA, 3-Methylcrotonyl-CoA und Acetyl-CoA-Carboxylasen) gebunden und ermöglicht über den Umweg einer aktivierten Form von Carboxybiotin den Transfer der CO₂-Gruppe auf Akzeptoren, wie z.B. Pyruvat (Krebs-Zyklus) und Oxalacetat (Lipogenese): es handelt sich daher um einen für den mitochondrialen Stoffwechsel entscheidenden Kofaktor.

- **ANGRIFFSPUNKTE ZUR VERZÖGERUNG DES HAARAUFSCHLAGS**

Erster Angriffspunkt

Dieser ist natürlich androgenetischer Natur: die Produktion von Dihydrotestosteron (DHT) durch die 5- α -Reduktase soll gestoppt werden. Dieser Metabolit ist aktiver als Testosteron (das über die Blutbahn transportiert wird), da er eine größere Affinität zu den in der Haarpapille lokalisierten androgenen Rezeptoren besitzt (ANDERSSON S., 2001). DHT wirkt atrophierend auf den Haarfollikel, und zwar - laut einer neueren Hypothese (SAWAYA et al, 2001) – über einen pro-apoptotischen Mechanismus der Caspase 3.

In der Haut liegen zwei Isoformen der 5- α -Reduktase vor, wobei die α 1-Form aktiver im Gesicht (vgl. Akne) und im Haarfollikel in der Haarpapille zu sein scheint, während die α 2-Form an Innen- und Außenseite der Epithelialscheide des Haarschafts (BAYNE et al, 1999) stärker in Erscheinung tritt.

Eine L'Oréal-Arbeitsgruppe (GERST, 2002) konnte in einer Struktur/Aktivitäts-Studie zeigen, dass die spezifischen Inhibitoren der α 2-Reduktasen in Kultur nicht gegen den Haarfollikel aktiv waren, im Gegensatz zu den spezifischen Inhibitoren der α 1-Reduktase oder den gemischten Inhibitoren der α 1- und α 2-Reduktasen.

Der Einsatz eines gemischten Inhibitors der 5- α 1- und 5- α 2-Reduktase, wie z.B. Finasteride® (ein Arzneimittel, das wegen seiner Aktivität gegen die 5- α 2-Reduktase ursprünglich zur Behandlung der Prostatahyperplasie entwickelt wurde), führte bei Personen mit manifester Kahlheit zu einer erheblichen Minderung des Haarausfalls.

So konnte nach einem Jahr durch eine einfache Inhibition der 5- α -Reduktase ein Zugewinn von 47% an Haaren im Anagenstadium erreicht werden (VAN NESTE et al, 2000).

Diese Wirkung ließ sich auf eine lokale Senkung der Konzentration von DHT (um 50%) zurückführen, wobei die so erhaltene Konzentration derjenigen einer normalen Kopfhaut entsprach (DALLOB et al, 1994).

Zweiter Angriffspunkt

Das zweite Ziel ist das Blut: der unerwartete Erfolg eines peripheren Vasodilators, Minoxidil®, der ursprünglich zur Behandlung der Hypertonie eingesetzt wurde und interessante Nebenwirkungen auf das Haarwachstum gezeigt hatte, wird mit dem Mechanismus einer guten Kapillardurchblutung erklärt.

Obwohl die Wirkung einer besseren Durchblutung nicht vernachlässigt werden sollte, ist mittlerweile bekannt, dass Minoxidil® ebenfalls über die Aufrechterhaltung der Proliferation von bereits differenzierten Keratinozyten des Haarfollikels wirkt (BOYERA N, 1997).

Dritter Angriffspunkt

Zu dieser hyperproliferativen Wirkung von Minoxidil® (Konzentrationen unter 100 μ M) kommt noch eine die Differenzierung fördernde Wirkung bei höheren Dosen (in der Größenordnung eines Millimols) hinzu, die durch eine Langzeitbehandlung und über eine lokale Akkumulation im Haarfollikel erzielt werden könnte. Alle Wirkungen zusammengenommen würde dies zu einem verzögerten Haarausfall führen: die hyperproliferative bzw. die Differenzierung fördernde Wirkung wäre damit der dritte Angriffspunkt.

2. DAS KONZEPT VON SEDERMA ZUR VERZÖGERUNG DES HAARAUSFALLS

In Anbetracht der aktuellen Kenntnisse der Morphogenese des Haares und den nach und nach entdeckten möglichen Ursachen für die Auslösung oder Verschlimmerung einer Alopezie, wird deutlich, dass man es mit einem sehr komplexen und aus mehreren Faktoren zusammengesetzten Mechanismus zu tun hat. Es ist also eine eher gewagte Angelegenheit, die Entwicklung des Haarfollikels und den Ablauf der Haarwachstumsphasen unter Kontrolle bringen zu wollen.

Darüber hinaus zeigen erst kürzlich durchgeführte genetische Studien, dass es zahlreiche Gene (mindestens 5) gibt, deren Mutationen Auswirkungen auf die Alopezie haben (SEDGWICK John, GQ Magazine, 1999).

Daher schien es uns wichtig, die bereits vorgezeichneten Bahnen – wie die androgene Komponente und die Vasodilatation – nicht zu vernachlässigen :

Wir haben zwei Wirkstoffe pflanzlichen Ursprungs gewählt, die eine Wirkung auf diese Angriffspunkte haben: die Oleanolsäure (Extrakt aus der Wurzel von *Loveyly hemsleya*, *Hemsleya amabilis*) für die Inhibition der $5\alpha 1$ - und $5\alpha 2$ -Reduktasen und Apigenin (Zitrusfrucht-Extrakt) für die Vasodilatation (ZHANG et al; 2000).

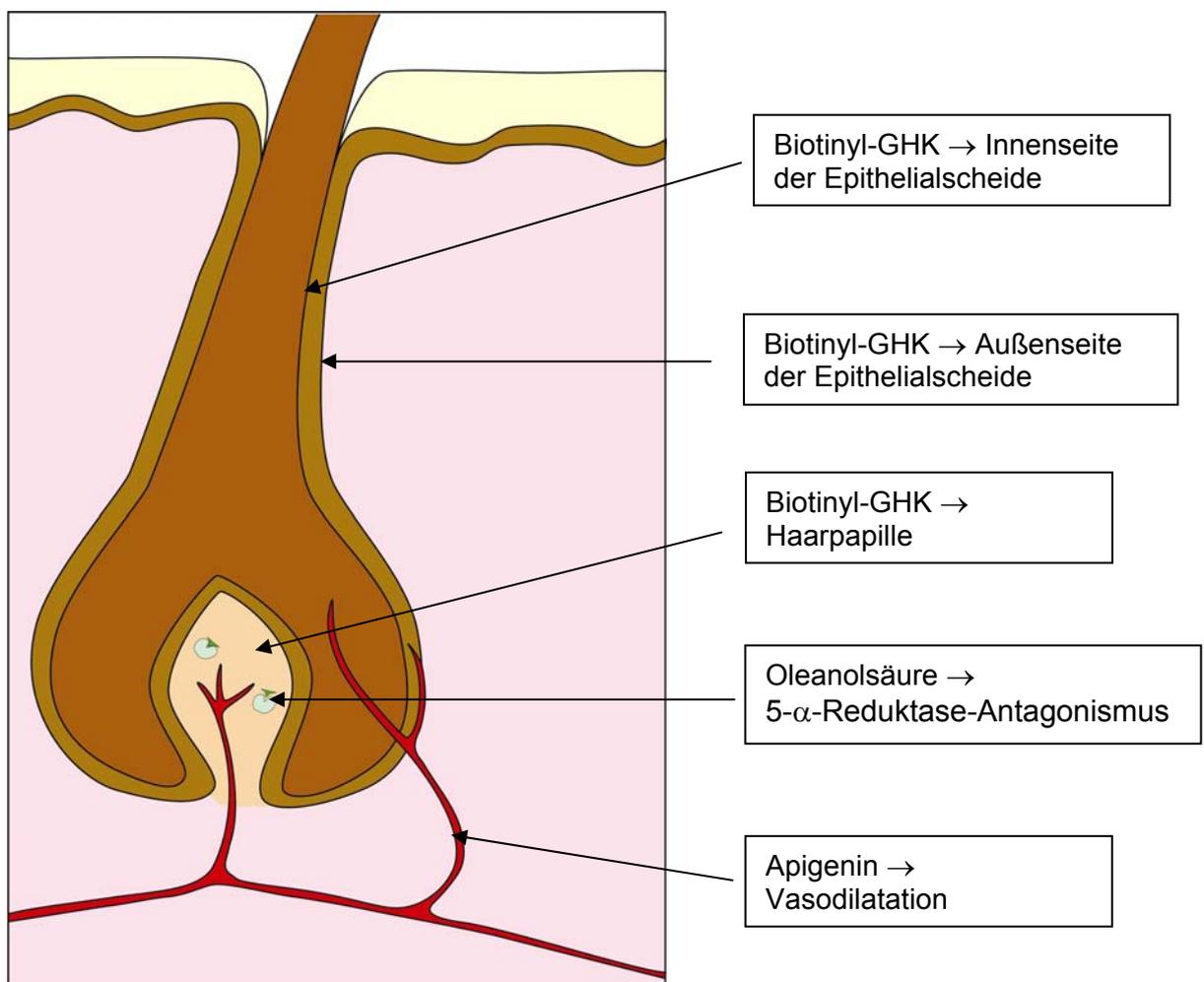
Anschließend haben wir diese beiden Wirkprinzipien durch eine gezielte Wirkung auf die Verankerung des Haares in der Haut ergänzt:

Wenn es gelingt, das Haar besser in der Haut zu "verankern", erreicht man einen besseren Halt (Haarpapille – Haarfollikel) mit einem besseren Austausch der chemischen Botenstoffe an dieser Verbindungsstelle. Ein erhöhter Stoffwechsel an der Verbindungsstelle hätte eine positive Auswirkung auf die Qualität und die Dauer des Anagenstadiums. Dementsprechend müsste es möglich sein, das Telogenstadium durch eine bessere Verankerung der Epithelialscheide und der Dermis hinaus zu zögern. Mit diesem Ziel vor Augen haben wir eine Peptidsequenz mit Matrix stimulierenden Eigenschaften ausgewählt – das Peptid Glycyl-Hystidyl-Lysin, das zu der Gruppe der Matrikine gehört (MAQUART et al, 1999). Dieses Tripeptid wurde an Vitamin H (Biotin) gekoppelt. Mangelzustände an Biotin drücken sich durch feine Haare und Alopezie, eine schlaaffe Haut und Dermatitis aus.

Wir haben eine neue Verbindung geschaffen: **Biotinyl-GHK, ein vitaminisiertes Peptid**, von dem wir eine doppelte Funktion sowohl auf die Matrix als auch auf den Stoffwechsel, erwarten.

So wurden also drei Wirkstoffe - Oleanolsäure zur Inhibition der 5- α -Reduktasen, Apigenin für eine bessere Durchblutung und Biotinyl-GHK für eine bessere Verankerung des Haares mit verstärktem Wachstum - in dieses neue Konzept eingebracht :

PROCAPIL™.



Angriffspunkte der Inhaltsstoffe von PROCAPIL™

Inhalt der vorliegenden technischen Dokumentation sind der mittels Aktivierung bestimmter Gene (DNA-Array) bestätigte Wirkungsmechanismus, die verstärkte Wirkung auf die Matrix, das Wachstum menschlicher Haarfollikel-Explantate in Kultur sowie die Ergebnisse einer Placebo-kontrollierten Studie mit einer Studiendauer von 4 Monaten.

3. **WIRKSAMKEITSSTUDIEN**

3.1. **in vitro-Studien**

3.1.1. **Studie an Haarfollikel-Explantaten in Kulturmedium** **(Substantivität des Peptids Biotinyl-GHK gegenüber dem Haarfollikel - Studie durchgeführt von BIOALTERNATIVES)**

Prinzip

Die Studie wurde an Explantaten menschlicher Haut (Abdominalplastik), die in einem Raum mit konstanter Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 21°C in PBS-Kulturmedium am Leben erhalten wurden, durchgeführt.

Am Schnittpräparat wurde immunhistologisch eine selektive Lokalisation des Produkts im Haarbereich in Gegenwart des Peptids untersucht.

Protokoll

Die Hautexplantate (mit Haarfollikeln) werden über eine Dauer von 18 h in Gegenwart des Peptids in einer Konzentration von 60 ppm inkubiert und mit den Kontrollexplantaten, die mit der Trägersubstanz ohne Peptid behandelt wurden, verglichen.

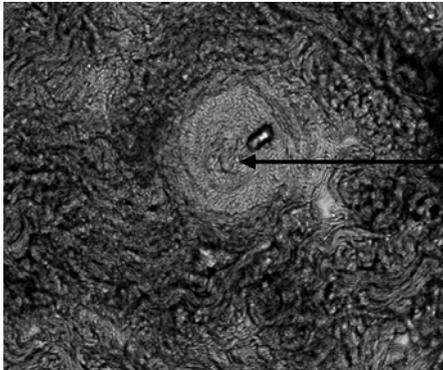
Die Versuche erfolgen in dreifacher Ausführung.

Nach 18 h wird in der Mitte jeder Vertiefung eine 8 mm große Biopsie entnommen und umgehend in Stickstoff tiefgefroren.

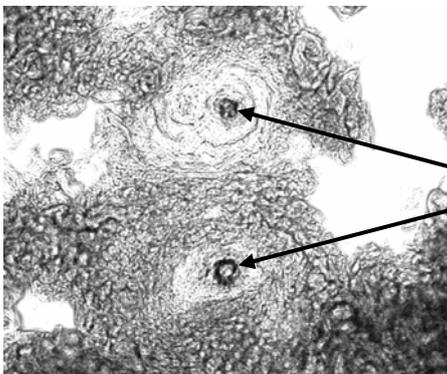
Anschließend werden im Kryostat Schnitte mit einer Dicke von 15µm angefertigt, getrocknet und fixiert. Die Gegenwart von Biotinyl-GHK wird mittels Immunmarkierung durch Kopplung an Streptavidinperoxidase nachgewiesen.

Ergebnisse

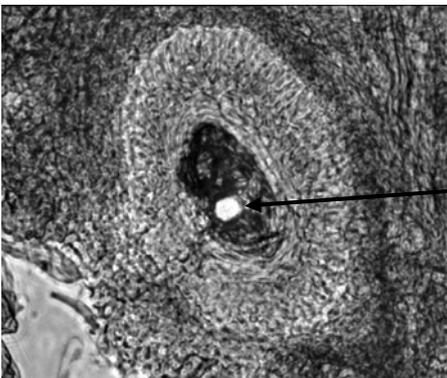
Die Schnittpräparate zeigen eine deutliche Lokalisation des Peptids Biotinyl-GHK um den Haarfollikel herum.



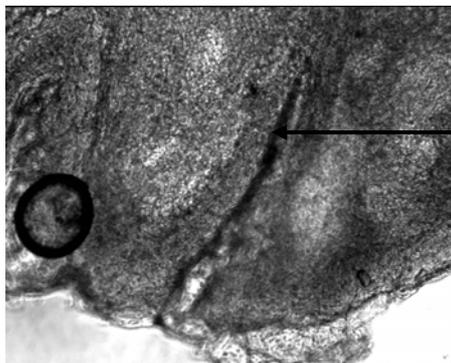
A: Bild des Kontrollexplantats, keine Markierung um den Haarschaft herum (20-fach vergrößert)



B: deutliche Lokalisation von Biotinyl-GHK um die 2 nebeneinander liegenden Haarschäfte herum (20-fach vergrößert)



C: bei 40-facher Vergrößerung ist der konzentrische Bereich um das Haar herum deutlich durch Biotinyl-GHK markiert



D: Längsschnitt, spezifische Lokalisation von Biotinyl-GHK mit guter Verteilung entlang des gesamten Haares und fehlender Markierung im umgebenden Gewebe (20-fach vergrößert)

Schlussfolgerung

Biotinyl-GHK ist ein Peptid mit guter Substantivität, das sich spezifisch an seinem Angriffspunkt - dem Haarfollikel - anlagert.

3.1.2. Anti-Aging-Studie an Haarfollikeln in Kultur (Studie durchgeführt von BIO-EC)

Prinzip

Überzählige Haarfollikel, die für eine Mikrotransplantation vorbereitet worden waren, werden in einem dem Nährmedium nach PHILPOTT et al, 1996 ähnlichen Nährmedium kultiviert.

Protokoll

Die Haarfollikel werden über eine Dauer von 14 Tagen einzeln bei einer Temperatur von 37° C in einem Nährmedium Luft/CO₂ (5%) inkubiert.

Die Explantate werden in unterschiedliche Proben aufgeteilt: Kontrollprobe in einfachem Nährmedium, mit einer positiven Kontrolle behandelte Probe und mit dem Peptid Biotinyl-GHK behandelte Probe.

Die Nährmedien werden alle 2 Tage erneuert.

Die Beobachtung der allgemeinen Morphologie erfolgt an Tag 0 und Tag 14.

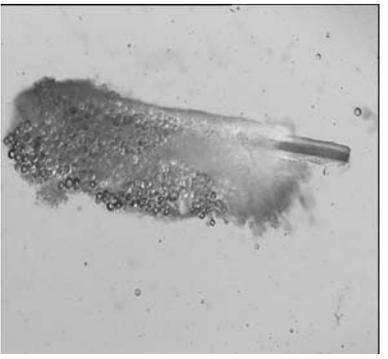
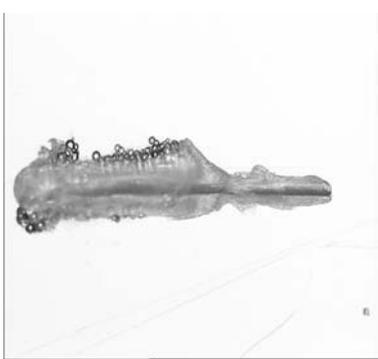
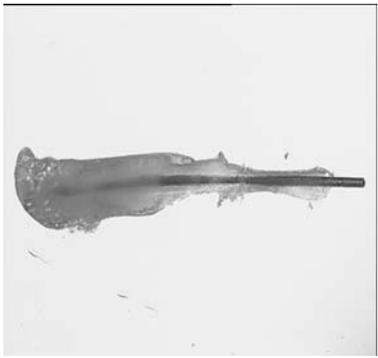
Zu denselben Zeitpunkten wird ein Teil der Haarfollikel für weitergehende Studien mittels Immunhistochemie tiefgefroren.

Um das Wachstum zu verfolgen, werden an den Tagen 0, 3, 5, 7, 11 und 14 digitale Aufnahmen angefertigt.

Ergebnisse zur allgemeinen Morphologie

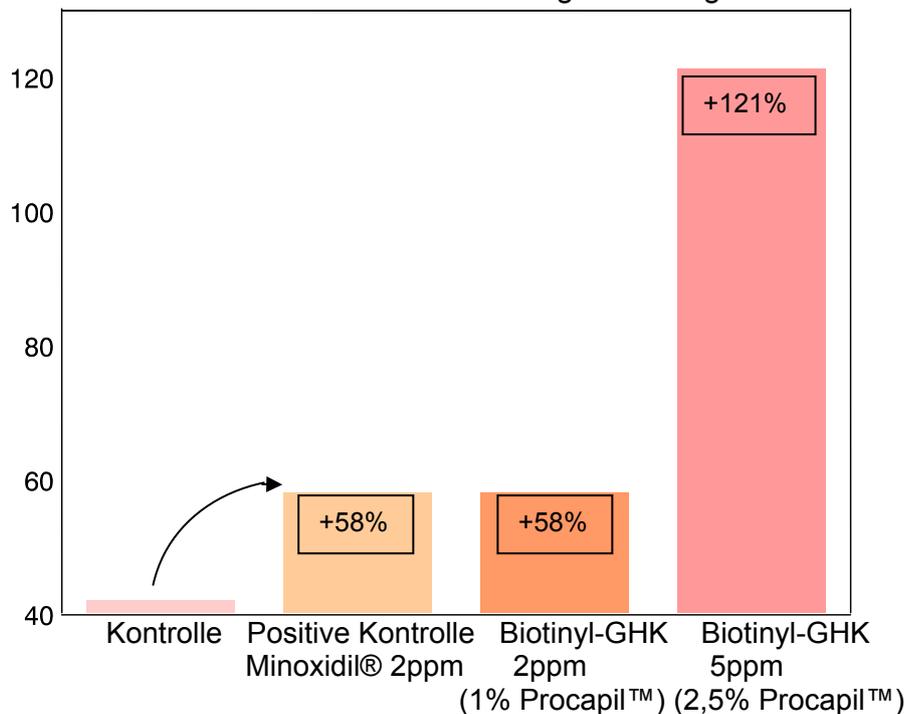
1. Wachstum des Haarschafts

Die Wachstumsmessungen werden am freien Teil des Haarschafts (außerhalb des unteren Teils der Haarzwiebel) durchgeführt.

Wachstum des Kontrollfollikels von Tag 0 bis Tag 14	Wachstum des Follikels in Gegenwart von Biotinyl-GHK von Tag 0 bis Tag 14	
		Tag 0
		Tag 7
		Tag 14

Die Ergebnisse sind in der folgenden Graphik dargestellt:

Wachstums des Haarschafts zwischen Tag 0 und Tag 14 in %



Schlussfolgerung

In Gegenwart von 2 ppm des Peptids (d.h. 1% **PROCAPIL™**) wird ein gegenüber der Kontrolle um +58% größeres Wachstum beobachtet, das dem Wachstum in Gegenwart von Minoxidil® 2ppm (10µM) entspricht. Bei 5ppm de Biotinyl-GHK (d.h. 2,5% **PROCAPIL™**) ist das Wachstum +121% größer als bei der Kontrolle.

2. Anti-Aging-Wirkung auf die Epithelialscheide

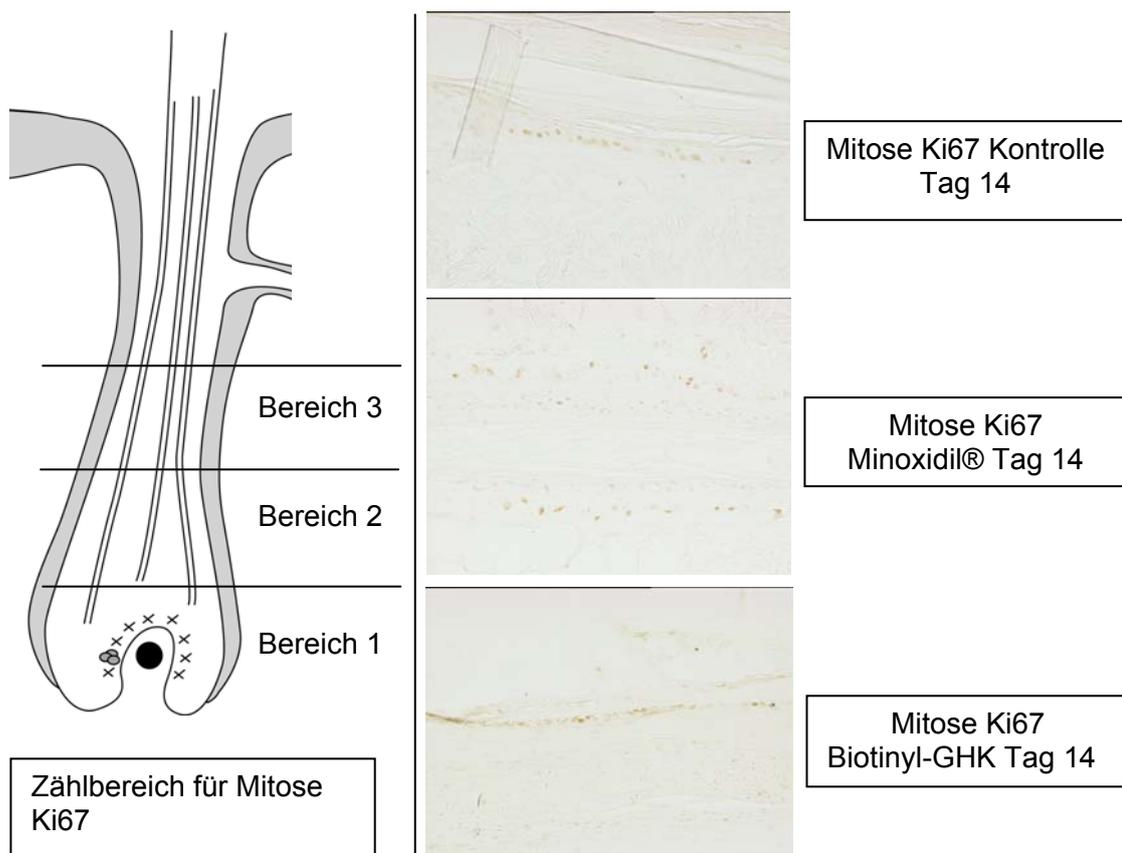
Prinzip

Verwendet wird der Mitosemarker Ki67, um eine Zellwachstumsaktivität nachzuweisen.

Protokoll

Die an Tag 0 und Tag 14 angefertigten Gefrierschnitte werden mit einem an Peroxidase gekoppelten Anti-Ki67-Antikörper behandelt.

Auf den Schnitten färben sich die in der Teilung begriffenen Zellen dunkelbraun. Am unteren Teil der Epithelialscheide des Haarschafts wird eine mikroskopische Zellzählung sämtlicher Zellen, in denen der Ki67-Marker zu finden ist, durchgeführt (Bereich 1).



Ergebnisse

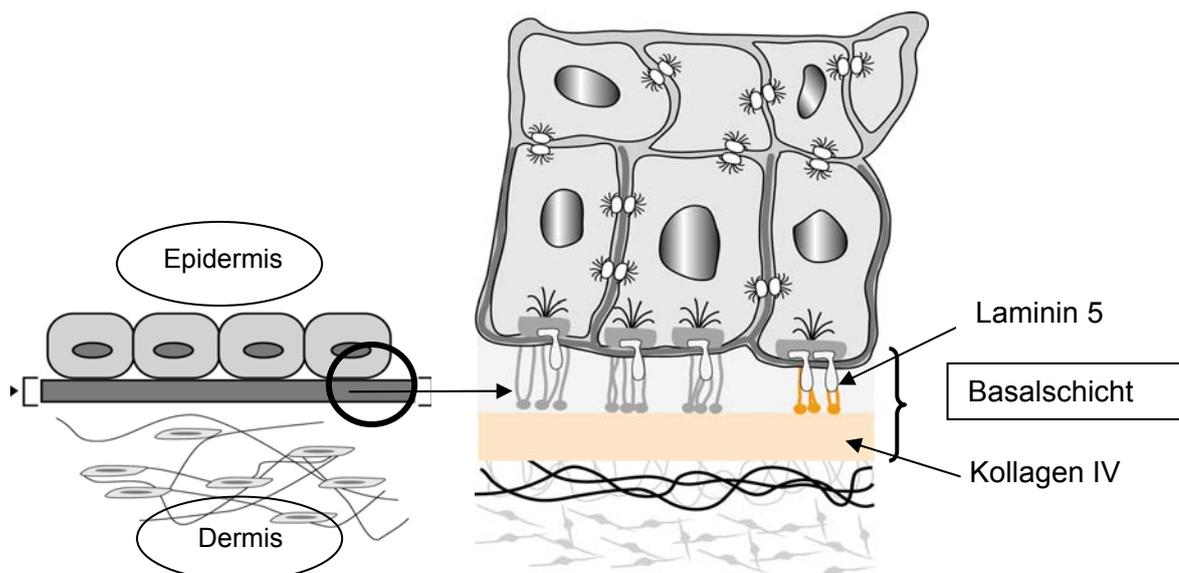
Die Ergebnisse zeigen eine Abnahme der in Mitose befindlichen Keratinozyten an der Haarzwiebel nach 14-tägiger Kultivierung, was auf ein Altern der Zellen hinweist.

Minoxidil® hält eine Proliferationsaktivität aufrecht (gemäß der Fachliteratur: BOYERA et al, 1997), was auch für Biotinyl-GHK in einer Konzentration von $0.3\mu\text{M}$ (2 ppm) und ungefähr $1\mu\text{M}$ (5 ppm) zutrifft. Die mit Biotinyl-GHK erzielte Wirkung ist besser, da es sich hier um 10-bis 30-mal geringere Konzentrationen handelt als bei Minoxidil® mit $10\mu\text{M}$ (2 ppm).

3. Stimulation der Adhäsionsproteine der Epithelialscheide und der Haarpapille

Prinzip

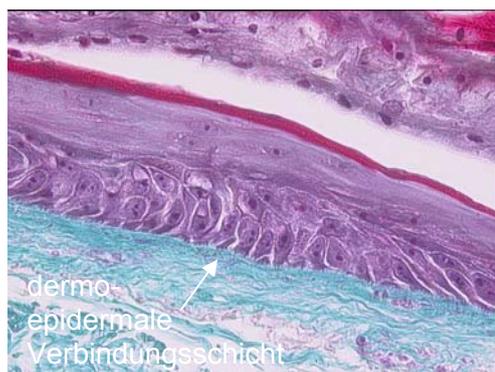
Die Qualität der Verbindung zwischen Dermis und Epidermis hängt von der Bildung einer dichten, an Laminin 5 und Kollagen IV reichen Basalschicht ab, an der die Keratinozyten der ersten Basalmembran anhaften.



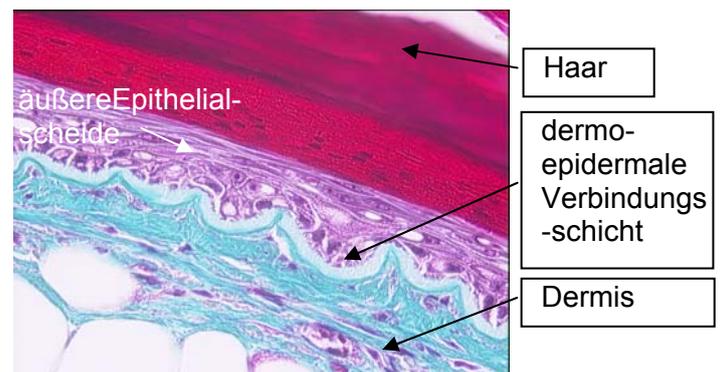
Verbindung zwischen Dermis und Epidermis

a) Die morphologische Beobachtung nach 14-tägiger Kultivierung zeigt bei der Kontrolle eine Verbindungsschicht zwischen Dermis und Epidermis, die auf der Außenseite der Epithelialscheide abgeflacht ist und ihre Basalschicht verloren hat.

Im Gegensatz dazu hat sich bei dem in Gegenwart von Biotinyl-GHK inkubierten Haarfollikel nach 14-tägiger Kultivierung eine deutlich abgegrenzte und sinusförmige Basalschicht erhalten. Diese beiden Strukturelemente sind unerlässlich für eine fest anhaftende und funktionsfähige Verbindungsschicht zwischen Dermis und Epidermis.



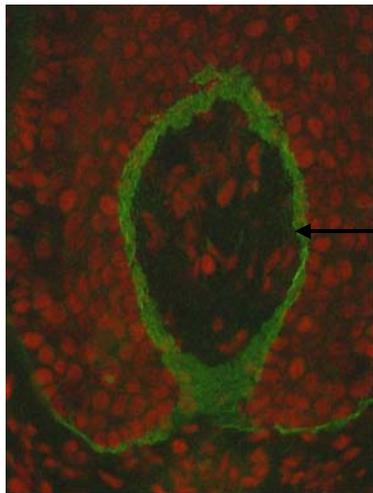
Kontrollprobe: 14 Tage



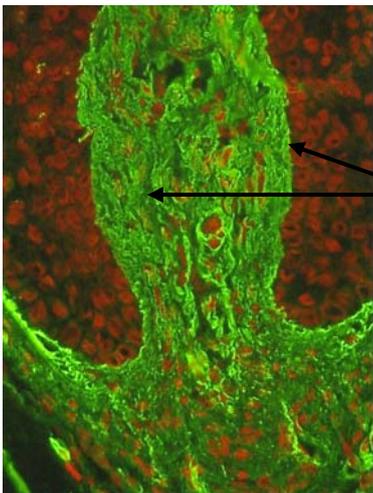
Behandelte Probe: 14 Tage

b) Laminin 5 und Kollagen IV sind zwei Proteoglykane, die ausschlaggebend sind für die Bildung der Basalmembran, der Verbindungszone zwischen Epidermis und Dermis, und beim Haar zwischen Epithelialscheide und Dermis. Diese Bestandteile der Matrix lassen sich mittels Immunmarkierung auf Gewebeschnitten darstellen.

Laminin 5 und Kollagen IV sind ebenfalls stark in der Haarpapille vertreten (JAHODA et al, 1992), wie es die Kontrollschnitte der kultivierten Haarfollikel an Tag 0 zeigen.



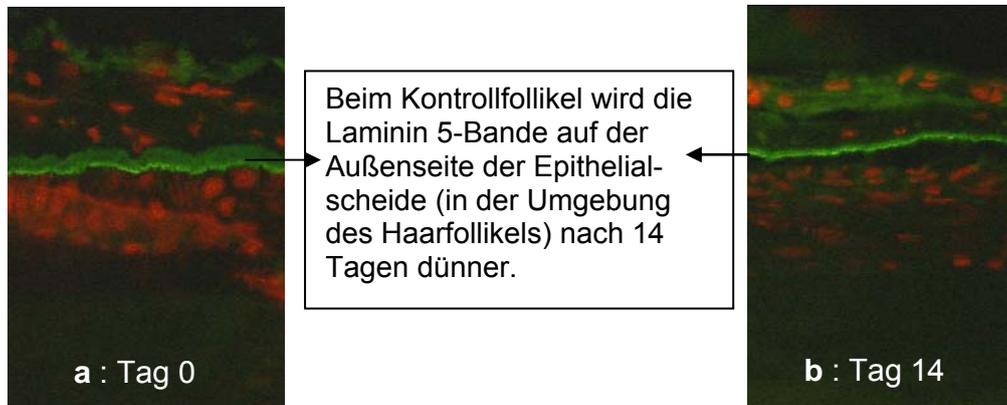
Laminin 5 an der Innenseite der Epithelialscheide, Verbindung mit der Haarpapille



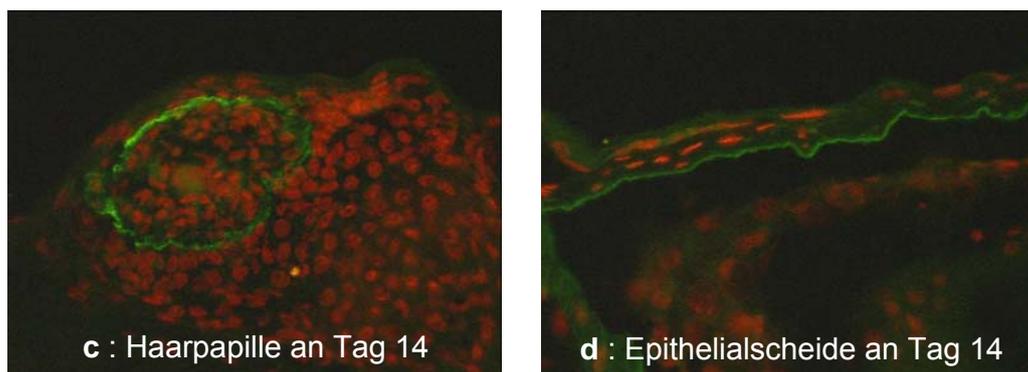
Kollagen IV an der Innenseite der Epithelialscheide und in der Haarpapille

Protokoll

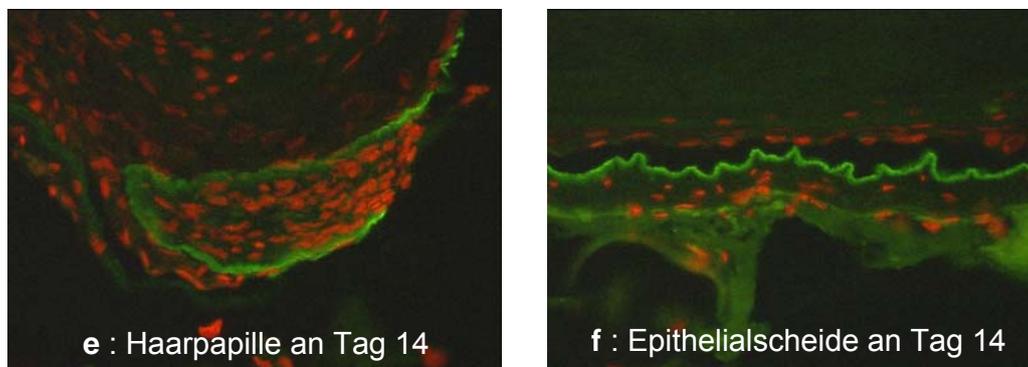
Die an Tag 0 und Tag 14 angefertigten Gefrierschnitte werden mit für Laminin 5 (Tebu) und Kollagen IV (Cliniscience) spezifischen fluoreszierenden Antikörpern behandelt. Die Schnittpräparate färben sich fluoreszierend grün, die mit Propidiumjodid vorgenommenen Gegenfärbungen der Kerne sind rot. Die Beobachtungen erfolgen am unteren Teil des Haarfollikels über und unter der Haarzwiebel (Bereiche 1 und 2 auf dem Schema Seite 15).

Ergebnisse**a) Laminin 5**

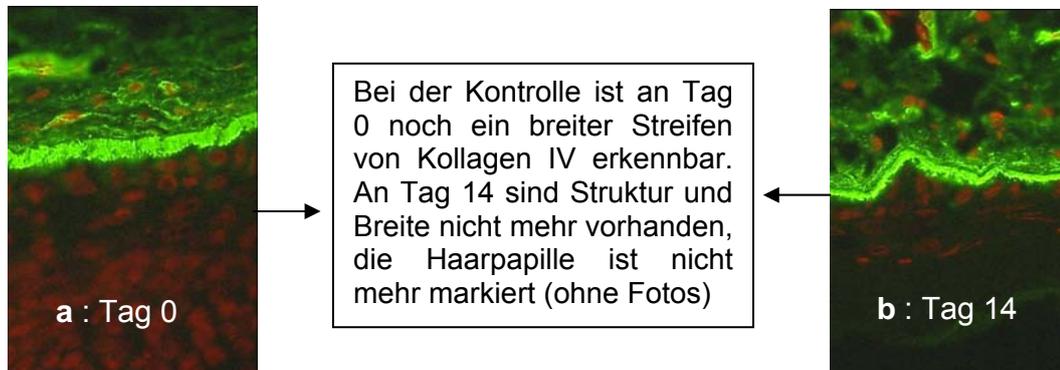
Aufgrund dieser Beobachtung wurde der Verlust an Laminin 5 an Tag 14 in Gegenwart verschiedener Produkte untersucht.



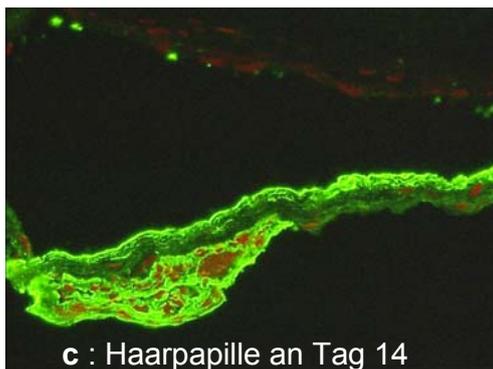
Nach Behandlung mit 2 ppm (10 μ M) Minoxidil® ist am Haarfollikel nach 14 Tagen noch ein breiter, bandartiger Streifen von Laminin 5 erkennbar.



Bei Behandlung mit 2 ppm (0,3 μ M) Biotinyl-GHK ist nach 14 Tagen noch eine deutlich erkennbare Laminin 5-Bande in der Haarpapille und an der Außenseite der Epithelialscheide vorhanden.

b) Kollagen IV

Aufgrund dieser Beobachtung wurde der Verlust an Kollagen IV an Tag 14 in Gegenwart verschiedener Produkte untersucht.



Nach Behandlung mit 2 ppm (10 μ M) Minoxidil® ist nach 14 Tagen ein Verlust an Kollagen IV in der Haarpapille und in der Epithelialscheide erkennbar.



In Gegenwart von Biotinyl-GHK ist Kollagen IV nach 14 Tagen noch deutlich in der Haarpapille (e) nachweisbar. In der Epithelialscheide (f) liegt es dicht und gut strukturiert vor. Die beobachtete Struktur entspricht praktisch der Struktur der Kontrolle an Tag 0 (a).

Schlussfolgerung

Wir konnten die Schutz- und Reparaturwirkung des Peptids Biotinyl-GHK auf die Bestandteile der Epithelialscheide und auf die Haarpapille - Kollagen IV und Laminin 5 - beobachten. An Haarfollikel-Explantaten, die 14 Tage lang in Kulturmedium aufbewahrt wurden, konnten wir zeigen, dass diese Wirkung ausgeprägter als die in Gegenwart von Minoxidil® beobachtete Wirkung ist. Die Konzentration des Peptids war dabei 30-mal geringer als diejenige von Minoxidil®.

Im Hinblick auf die allgemeine Morphologie besitzt Biotinyl-GHK eine ausgeprägte Anti-Aging-Wirkung auf die Keratinozyten des Haarfollikels (14-tägige Kultur), wobei die Epithelialscheide funktionsfähig bleibt (Mitosen, Ki67) und eine bessere Struktur der Adhäsionsproteine aufweist (Kollagen IV und Laminin 5), die für die Verankerung in der Dermis verantwortlich sind.

3.1.3. Genaktivierung durch PROCAPIL™ **(Studie BIOALTERNATIVES)**

Prinzip

Mittels einer DNA-Array-Studie kann auf Basis einer Bibliothek mit 600 Genen, die wegen ihrer Bedeutung für die Zellfunktion ausgewählt wurden, mit positiv oder negativ modifizierten Markergenen ein Profil der Mechanismen erstellt werden, durch die ein kosmetischer Wirkstoff in der Keratinozyten- und Fibroblastenpopulation wirkt.

Protokoll

Diese DNA-Array-Studie wurde an rekonstruierter Epidermis SkinEthic®, die in Gegenwart von **PROCAPIL™** (Komplex aus den 3 Wirkstoffen : Peptid Biotinyl-GHK, Oleanolsäure und Apigenin) inkubiert wurde, durchgeführt.

Die Dauer der Inkubation betrug 18 h. Die in den Zellen gebildeten mRNA-Sequenzen wurden in die entsprechenden DNA-Sequenzen umgewandelt (RT-PCR-Verfahren), um ein im Vergleich zu den Kontrollkulturen auswertbares Signal zu erhalten.

Das hieraus resultierende Bild gibt die nach 18-stündiger Inkubation mit **PROCAPIL™** aktivierten oder unterdrückten Gene wieder.

Ergebnisse

In den Tabellen auf den folgenden Seiten werden die Ergebnisse zusammengefasst, die im Vergleich zu der Kontrolle signifikant sind, d.h. es liegt eine positive oder negative Abweichung von mindestens 30% vor.

Bei geringeren Abweichungen (20 bis 30%), die sich an mehreren verwandten Genen beobachten lassen, werden diese Ergebnisse als von einer gewissen Signifikanz in Bezug auf den Mechanismus erachtet.

**Im Vergleich zur Kontrolle positiv regulierte Gene (100%),
die für Proteine kodieren :**

Variation der Genexpression in Gegenwart von PROCAPIL™	%
<u>Adhäsionskomplexproteine</u>	
Desmosomal proteins 1&3 (Desmogleins)	135% / 138%
Desmocollin 1	146%
Fibronectin receptor β -subunit	134%
Vimentin	138%
Laminin binding protein	146%
Integrin β 1 & β 2	134% / 144%
<u>Antioxidierende Enzyme</u>	
Thioredoxins peroxydases (TDPX2 & AO372)	152 und 174%
SOD (mitochondrial & cytosolic)	150 und 169%
Metallothioneins MTH & HMT	188 und 190%
CYP b-reductase	160%
<u>Stressproteine</u>	
HSP 27	164%
HSP 90	139%
<u>Entzündungshemmende Proteine</u>	
Interferon γ antagonist	135%
<u>Enzyme des Zellstoffwechsels</u>	
Mitochondrial trifunctional protein & Acyl CoA precursor	123 und 128%
Ornithin decarboxylase	132%
Glutamin synthetase	136%
Acetyl CoA transferase	137%
Isocitrate deshydrogenase	189%
Inos	143%
NADP isocitrate deshydrogenase	189%
<u>Proliferationsmarker / Differenzierungsmarker</u>	
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	191%
Cytokeratins 10/14/16	154 / 150 / 144%
Steroid receptor co-activator	160%

**Im Vergleich zur Kontrolle negativ regulierte Gene (100%),
die für Proteine kodieren:**

Variation der Genexpression in Gegenwart von PROCAPIL™	%
<u>Entzündungsfördernde Proteine</u>	
Interferon γ receptor	-57%
<u>Faktoren der Angiogenese und der Matrixmodellierung</u>	
Vitronectin	-52%
TIMP1/TIMP2	-43% / -24%
Antichymotrypsin α 1	-43%
Lysyl hydroxylases 1&2	-50% / -29%
Heparan sulphate proteoglycan	-40%
Collagen1 subunit	-46%
<u>Regulierung der Zellproliferation</u>	
Retinoic binding proteins CRABP1/CRABP2	-34% / -63%
Vit D3 receptor	-40%

Auswertung

Die aktivierten Gene ergeben ein auf eine starke Wachstumsaktivität ausgerichtetes Zellprofil, wobei die Expression der Enzyme des Zellstoffwechsels sehr hoch ist (123% bis 189% je nach Enzym); daran sind auch die antioxidativen Enzyme beteiligt, da die Zelle gegen die freien Sauerstoffradikale geschützt werden muss, die bei einer gesteigerten Stoffwechselaktivität systematisch gebildet werden.

Die Marker der Zellproliferation, wie Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), steroid receptor co-activator, cytokeratins 10/14/16 (Proliferation und Differenzierung) sind stark erhöht und stehen auch in Verbindung mit dem Protein HSP27 (164%), das eine starke Differenzierungsaktivität signalisiert (JONAK, 2002).

Diese Differenzierung geht mit dem Anstieg mehrerer Adhäsionsproteine einher: der Proteine, die die Kohäsion zwischen den Zellen sowie die Adhäsion und die Anordnung der Keratinozyten in Zellschichten (Desmoglein, Desmokollin) ermöglichen; der Proteine, die an der Anhaftung der Basalschicht beteiligt sind (laminin binding protein, vimentin, integrin α und β) und schließlich der Proteine, die die Verankerung in der umliegenden Dermis gewährleisten (Desmogleine, Desmokolline).

Bei den deaktivierten Genen lässt sich eine Abnahme der Expression des Interferonrezeptors (-57%) beobachten, die im Zusammenhang mit dem Anstieg des Interferonantagonisten (+135%) steht, wobei diese beiden Faktoren einen stark entzündungshemmenden Beitrag leisten.

Darüber hinaus befinden sich diejenigen Gene vorübergehend im Ruhezustand, die an der Remodellierung der Matrix und der Angiogenese beteiligt sind, während die Zellproliferation durch eine Abnahme der Faktoren, die sich negativ auf sie auswirken, gestärkt wird: CRABP 1/2 (cytoplasmic retinoic acid binding proteins) und der Vitamin-D3-Rezeptor (Transkriptionsfaktor für die Zellproliferation und Zelldifferenzierung).

Die Vorteile dieser Marker :

Desmogleine sind für die Adhäsion der Keratinozyten untereinander unverzichtbare Adhäsionsproteine (GARROD et al, 2002; NUBER et al, 1996), die an der Bildung der Außenseite der Epithelialscheide des Haares beteiligt sind ("äußere Wurzelscheide").

Sie spielen ebenfalls eine Rolle bei der Verankerung dieser Epithelialscheide in den Hautstrukturen: Knock-out-Mäuse, bei denen die Desmogleingene deaktiviert wurden, verlieren vorzeitig ihr im Telogenstadium befindliches Fell (Hanakawa Y, 2002).

Vimentin ist ein von den Keratinozyten an der Verbindung zwischen Epithelgewebe und Mesenchym (Dermis) gebildeter Bestandteil der Matrix, der eine Rolle in der Morphogenese des Haares spielt (TAMIOLAKIS et al, 2001).

Die Zytokeratine 10 (Differenzierung), 14 und 16 (Morphogenese des Haares und Proliferation der Keratinozyten), sowie die Enzyme des Zellstoffwechsels und die Marker der Zellteilung (proliferating cell nuclear antigen) sind charakteristisch für eine Hyperaktivität der Keratinozyten, die neues Gewebe bilden.

Es ist interessant zu beobachten, dass der Vitamin-D3-Rezeptor und die Retinsäurerezeptoren (CRABP 1/2) vorübergehend in den Ruhezustand versetzt werden: die Hemmung der Transkription wird demnach aufgehoben und die Neubildung von DNA, die Zellproliferation (KROHN et al, 2003) und das Überleben des Haarfollikels gefördert (BILLONI, 1997).

Deren Aktivitätsniveau wird ebenfalls von Steroiden, wie beispielsweise Androgenen, zu denen Dihydrotestosteron (DHT) zählt, beeinflusst. Somit weist die geringe Expression auch auf das Fehlen einer derartigen Aktivierung hin.

Zwischen den Retinoidrezeptoren, den Steroidrezeptoren und den Vitamin-D3-Rezeptoren (sowie dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein ihrer Koeffektoren) bestehen subtile Wechselwirkungen, so dass es sich hierbei um wichtige Faktoren für die Morphogenese des Haarfollikels handelt.

Die Wirkung von **PROCAPIL™** erfolgt daher über diese für die Morphogenese und das Wachstum des Haares essentiellen Faktoren.

In den verschiedenen aktivierten Genen lässt sich die Wirkung des Peptids Biotinyl-GHK (Adhäsionsgen, Proliferationsgen), von Biotin (starke mitochondriale Aktivität) und der Oleanolsäure (Deaktivierung der CRABP-1/2-Bahnen und von Vitamin D3) erkennen.

Schlussfolgerung aus den Daten der *in vitro*-Studien

Es besteht eine bemerkenswerte Übereinstimmung zwischen den mittels DNA-Array an rekonstruierter Epidermis und mittels Morphologiestudie an menschlichen Haarfollikel-Explantaten erhaltenen Daten:

- **Starke Anti-Aging-Aktivität (Nachweis mit Ki67), bessere allgemeine Morphologie (Epithelialscheide und Haarpapille), aktivierte antioxidierende Zellenzyme und Marker der PCNA-Proliferation.**
- **Starke Neubildung von Adhäsionskomplexproteinen (Kollagen IV, Laminin 5, Vimentin, Desmogleine und Desmokolline).**
- **Deutliche Stimulation des Zellstoffwechsels (mitochondriale Enzyme) und Aktivierung des Wachstums (Haarschaft und Zytokeratine 10, 14 und 16).**

Alle diese Daten zusammen ergeben das Profil eines Produkts, das die Morphogenese des Haares begünstigt und die Verankerung der Epithelialscheide in der Dermis verstärkt.

Es handelt sich um ein Produkt mit hoher Substantivität, das sich spezifisch am Haar anlagert (Immunlokalisierung entlang des Haarfollikels, Abwesenheit im umliegenden Gewebe).

3.2. *In vivo*-Studien

Placebo-kontrollierte klinische Studie über 4 Monate (Studie durchgeführt von Laboratoires DERMSCAN)

Prinzip

Da vorwiegend Männer von beginnender Kahlheit betroffen sind, wurde eine Studie mit männlichen Probanden durchgeführt bei denen dieses Problem besteht. Die 4-monatige Dauer wurde festgelegt, um eine gesamte Telogenphase abzudecken.

Die Entwicklung des Verhältnisses A/T (Anteil der Haare im Anagen- und Telogenstadium) wurde mittels Videotrichogramm verfolgt.

Protokoll

- Aufnahmekriterien

35 männliche Probanden kaukasischen Typs, zwischen 18 und 50 Jahren, deren Anteil an Haaren im Telogenstadium höher als 20% war.

- Besondere Ausschlusskriterien

Weißes Haar am Scheitel.

Erkrankungen der Kopfhaut.

Einnahme von Kortikoiden, Immunsuppressiva, Retinoiden seit weniger als 6 Monaten und entzündungshemmenden Arzneimitteln seit weniger als 1 Woche.

Lokale Anwendung von Minoxidil® oder jedes anderen lokalen oder oralen Mittels gegen Haarausfall, trophische Behandlung der Haare innerhalb der letzten 3 Monate.

Topische oder orale Behandlung der Kopfhaut (gegen Seborrhöe oder Schuppen, tägliches Einreiben innerhalb der letzten 4 Wochen). Veränderung der Ernährungsweise oder der sportlichen Betätigung im Laufe der Studie.

Übermäßiger Konsum von Alkohol oder Tabak.

- Anwendung des Produkts

Produkt oder Placebo wurden zweimal täglich mit einer leichten Massage auf die Kopfhaut aufgebracht.

Das Produkt **PROCAPIL™** wurde in einer Konzentration von 3% in eine wässrig-alkoholische Lotion eingearbeitet, die ebenso wie der Placebo in einer farblosen Lösung vorlag (Zusammensetzung s. Anhang 1).

- Einhaltung der Versuchsbedingungen / Verträglichkeit

Nach 4, 8 und 12 Wochen fand eine Kontrolle hinsichtlich Einhaltung der Bedingungen und Verträglichkeit statt.

Zum Zeitpunkt T0 und zum Zeitpunkt T4 Monate erfolgte eine klinische Untersuchung der Kopfhaut durch einen Dermatologen sowie eine Beurteilung der Verträglichkeit durch Befragung der Probanden.

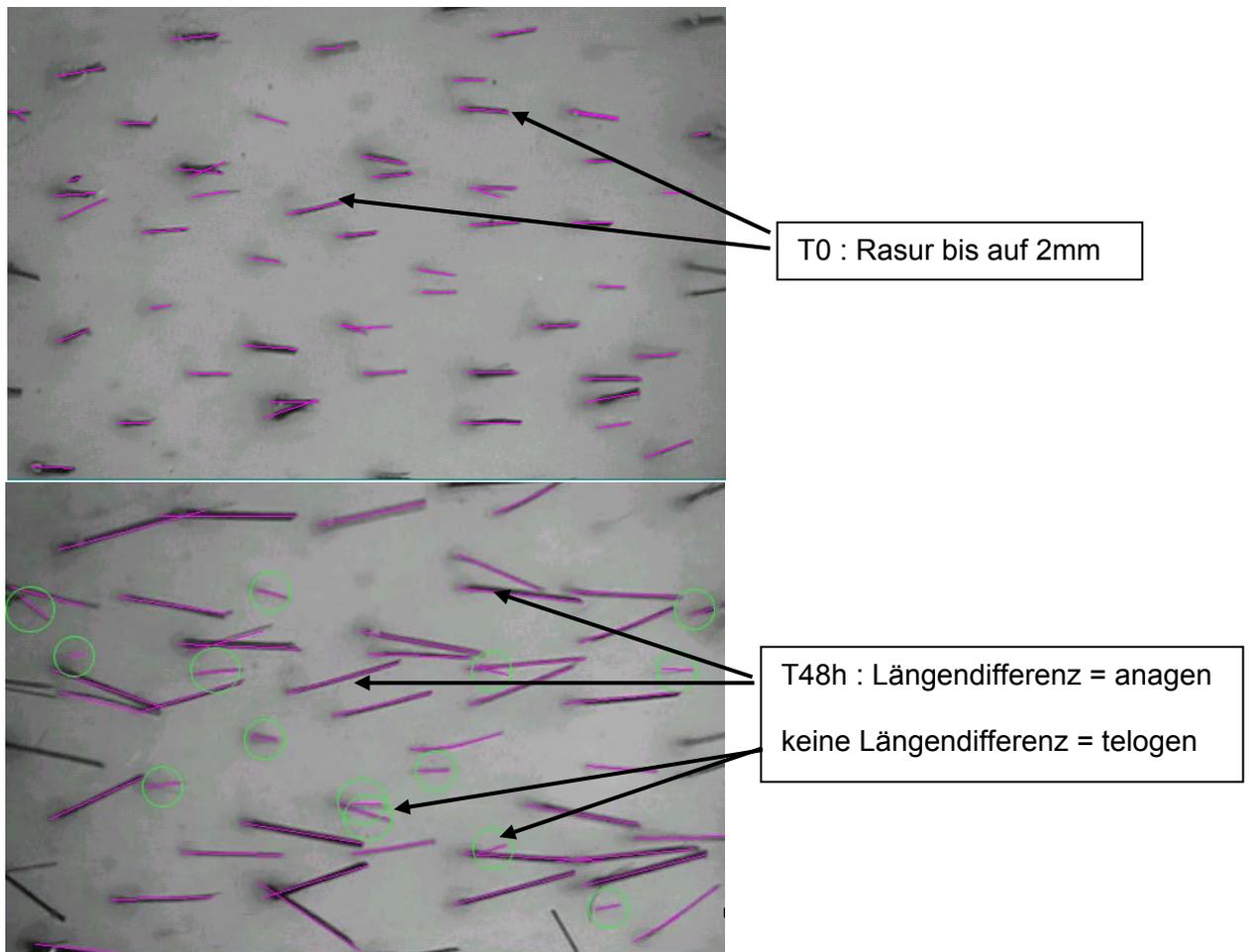
- Videotrichogramm

Bei dem verwendeten Gerät handelt es sich um ein Videomikroskop MORITEX SCOPEMAN® MS-500 mit einem beweglichen Faseroptikobjektiv mit 25facher Vergrößerung, das mit einem digitalen Bilderfassungssystem gekoppelt ist.

Die Bilder werden mittels der Software COUNT-HAIR® ausgewertet, die von Laboratoires DERMSCAN entwickelt wurde.

Die Bilderfassung zum Zeitpunkt T0 und zum Zeitpunkt T4 Monate erfolgte nach Lokalisierung am selben rasierten Haarbereich (mit durchschnittlich 200 Haaren / 1 cm²).

Länge und Wachstumsgeschwindigkeit der Haare sowie der Anteil der Haare im Anagen- und Telegonstadium wurden beobachtet.



- Entnahme der Haarprobe: morphologische Analyse und Immunmarkierung von Kollagen IV und Laminin 5.

Zum Zeitpunkt T0 und am Ende der Studie werden bei jeweils 6 Probanden aus der behandelten und aus der Placebogruppe mittels einer Enthaarungspinzette 24 Haare am Rand des von Alopezie betroffenen Bereichs entnommen.

Die Haare werden entweder mittels Bouin-Reagenz fixiert (12 Haare) oder sofort tiefgefroren (12 Haare) und zur Analyse an BIO-EC geschickt.

Ergebnisse

a) Klinische Studie

Von den 35 für die Studie ausgewählten Probanden bildeten 18 Probanden die mit **PROCAPIL™** behandelte Gruppe (37 ± 2 Jahre), und 17 Probanden die Placebogruppe (38 ± 1 Jahre), wobei die Zuteilung in die jeweilige Gruppe randomisiert erfolgte.

▪ Verträglichkeit

PROCAPIL™ wurde in den 4 Monaten der Anwendung von sämtlichen Probanden sehr gut vertragen.

▪ Videotrichogramm

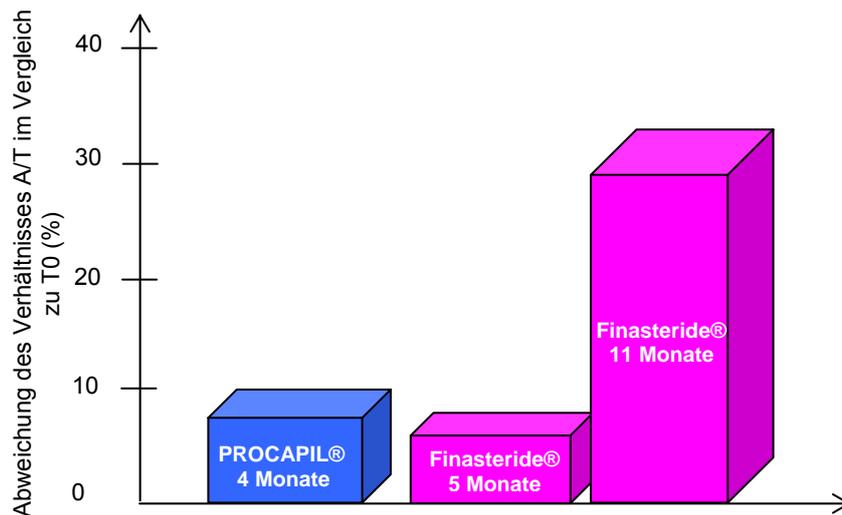
Klinischen Studien, mittels derer die Auswirkung einer Behandlung auf die Gesundheit von Haar und Kopfhaut bestimmt wird, arbeiten mit unterschiedlichen Bewertungskriterien. Die Haardichte (Anzahl Haare pro cm^2) ist sinnvoll für ein Produkt, welches ein verstärktes Haarwachstum auslöst. Um die Verankerung und die Vitalität derjenigen Haare, die noch vorhanden sind zu untersuchen, sind die prozentualen Anteile der Haare im Anagen- und Telogenstadium (Wachstum oder Ausfall) ebenso wie deren Verhältnis zueinander besser geeignet. Deswegen haben wir für unsere Studie letzteren Parameter gewählt.

Verhältnis Anagen- / Telogenstadium

Das erste Diagramm der folgenden Seite zeigt die Verhältnisse der Haare in Anagen- und Telogenstadium nach einer 4-monatigen Behandlung. Im Vergleich dazu werden die veröffentlichten Ergebnisse einer 5- und 11-monatigen oralen Finasteride®-Behandlung dargestellt (Van Neste et al. 2000).

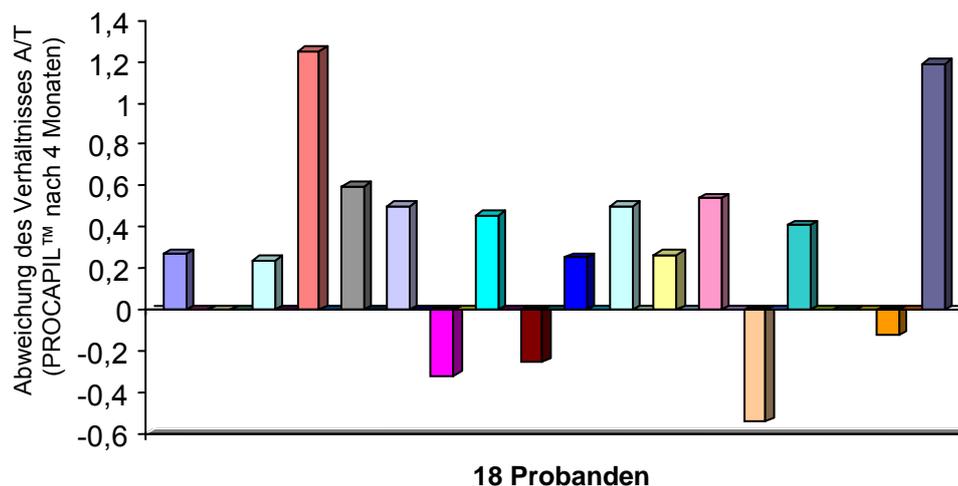
Nach 4-monatiger Behandlung mit **PROCAPIL™** ist bei den Probanden eine deutliche Verbesserung des Verhältnisses Anagen- zu Telogenphase zu beobachten. Dieses ist signifikant besser im Vergleich zu T0 (+10%, $p < 0,05$). Bei der Placebo-Gruppe zeigt sich keine Veränderung (nicht dargestellt). Ein Vergleich mit den Literaturdaten der oralen Finasteride®-Behandlung zeigt eine deutliche Wirkung von **PROCAPIL™**

Tatsächlich wird für Finasteride® nach 5 Monaten eine leichte Abweichung des Verhältnisses A/T von 8% im Vergleich zu T0 (siehe untenstehende Grafik), festgestellt, die nach 11 Monaten 33% erreicht.



In der PROCAPIL™ Gruppe ist bei 67% der Probanden eine Steigerung des Verhältnisses A/T zu beobachten. Bei 3 dieser 12 Personen erreicht die Steigerung 31,2%, 33,5 % bzw. 46,3%.

Im Gegensatz dazu beobachtet man bei der Placebo-Gruppe eher die Tendenz einer abnehmenden Anzahl im Anagenstadium.



Geschwindigkeit des Haarwachstums

Die durchschnittliche Geschwindigkeit des Haarwachstums verändert sich im Studienverlauf nicht signifikant. Allerdings beobachteten 8 Probanden der PROCAPIL™-Gruppe ein tendenziell schnelleres Wachstum.

In der Placebo-Gruppe verlangsamt sich die durchschnittliche Geschwindigkeit tendenziell um 3% und bei der Mehrheit der Probanden (11 von 16) ist keine Veränderung zu beobachten.

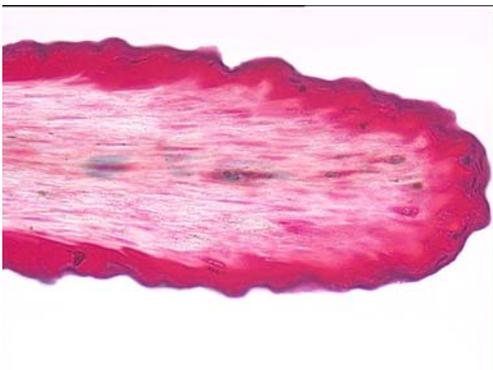
Aufgrund dieser Ergebnisse kommen wir zur Schlussfolgerung, dass PROCAPIL™ den Haarausfall vor allem durch seine Wirkung auf die Verankerung des Haares in der Kopfhaut verlangsamt. Die Fotos im folgenden Kapitel belegen diese Wirkung.

b) Morphologische Veränderungen der Haare nach 4 Monaten

Zwischen den beiden Gruppen lassen sich nach 4 Monaten reproduzierbar Unterschiede an den Haaren im Telogenstadium (durch Ausreißen entnommen) beobachten.

▪ Unterschied zwischen PROCAPIL™ und Placebo nach 4 Monaten

Die mit PROCAPIL™ behandelte Gruppe zeigt wesentlich besser strukturierte Haarzwiebeln:

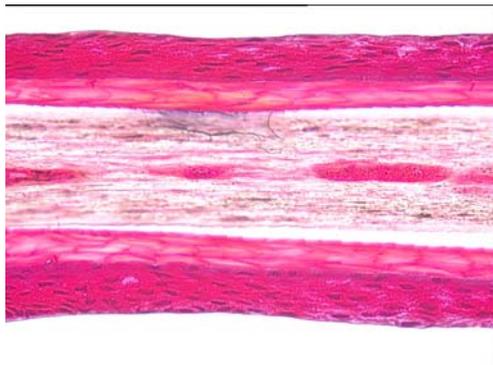


Placebo T4 Monate (Haarzwiebel)



PROCAPIL™ T4 Monate (Haarzwiebel)

Ebenso zeigt die Epithelialscheide eine gut differenzierte zelluläre Verankerung mit dem Haarschaft an der Innenseite, wodurch auf der Außenseite (Verankerung an der Dermis) eine Verbindungsschicht sehr guter Qualität entsteht.



Placebo T4 Monate (Epithelialscheide)



PROCAPIL™ T4 Monate (Epithelialscheide)

- Unterschied T0/T4 Monate an Haaren im Anagen- und Telogenstadium

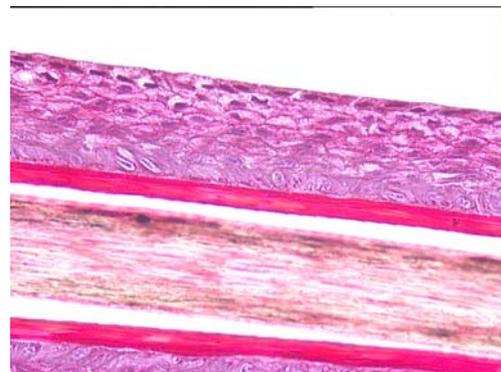
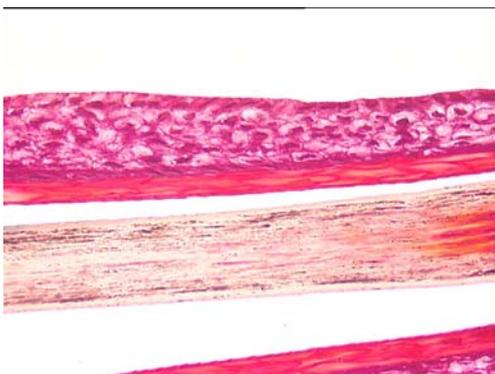
Bei ein und demselben Probanden lassen sich deutliche Unterschiede zwischen Zeitpunkt T0 und T4 Monate beobachten.

Wie unten zu sehen, zeigt der Bereich der Haarzwiebel des im Telogenstadium befindlichen Haares eine deutliche Verbesserung:



PROCAPIL™ T0 (telogene Haarzwiebel) **PROCAPIL™ T4 Monate** (telogene Haarzwiebel)

Die Epithelialscheide der Haare im Anagenstadium zeigt ebenfalls eine Verbesserung: sie ist dicker und die Zellschichten sind deutlicher ausgebildet.

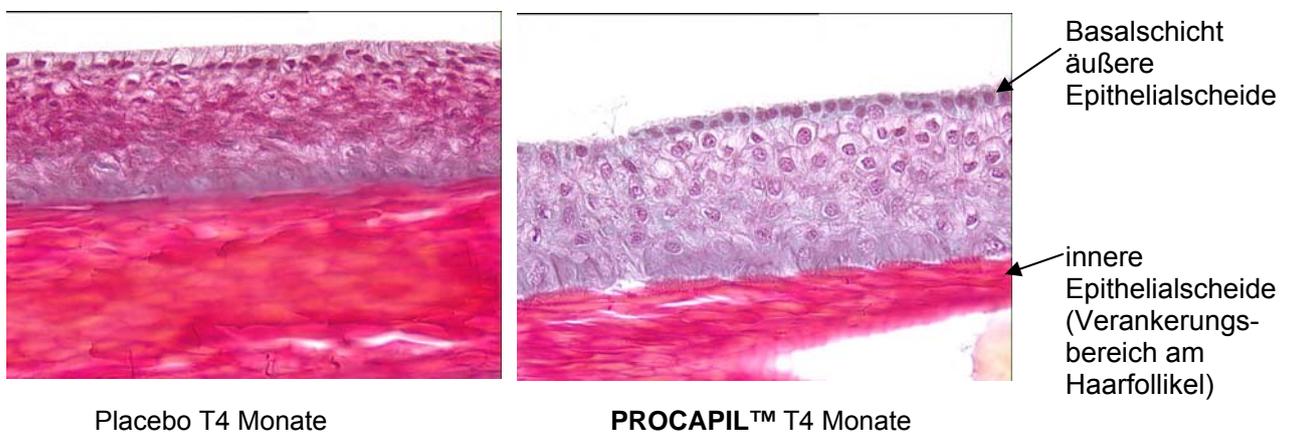


PROCAPIL™ T0 (anagene Epithelialscheide) **PROCAPIL™ T4 Monate** (anagene Epithelialscheide)

In der mit **PROCAPIL™** behandelten Gruppe weist die Epithelialscheide eine hohe Qualität auf: die Basalschicht ist perfekt strukturiert und somit auf der Außenseite des Haares zu einer optimalen Adhäsion von Epidermis und Dermis fähig.

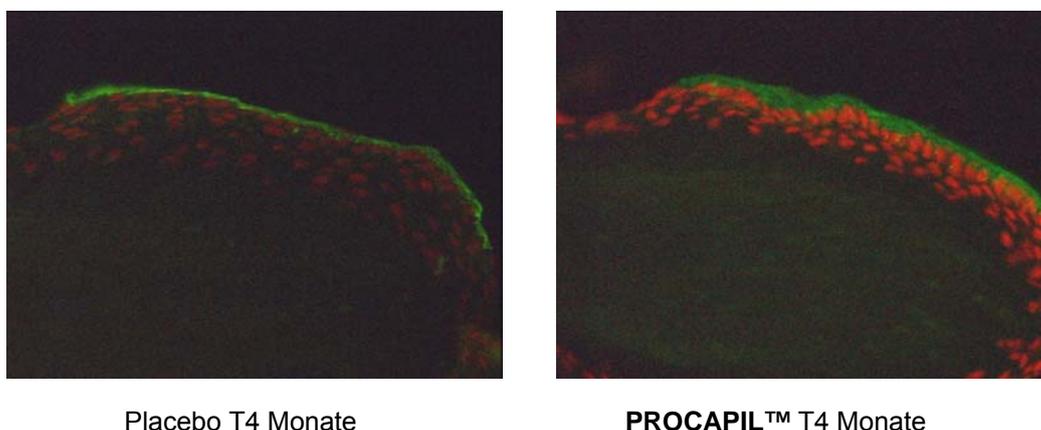
Auf der Innenseite der Epithelialscheide lassen sich ebenfalls die Bereiche der Verankerung mit dem Haarschaft erkennen.

Im Gegensatz dazu sind diese beiden Bereiche in der Placebo-Gruppe schlecht strukturiert.

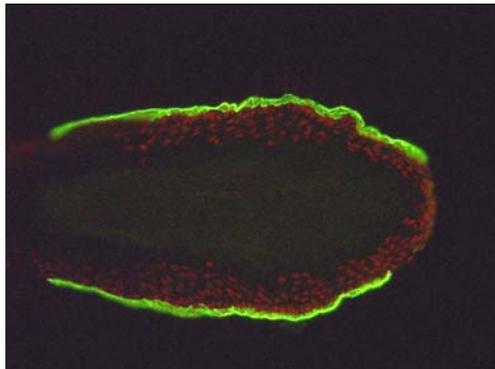


Die mittels Immunfluoreszenz erhaltenen Informationen über die Marker Kollagen IV und Laminin 5 unterstützen die vorausgehenden Beobachtungen.

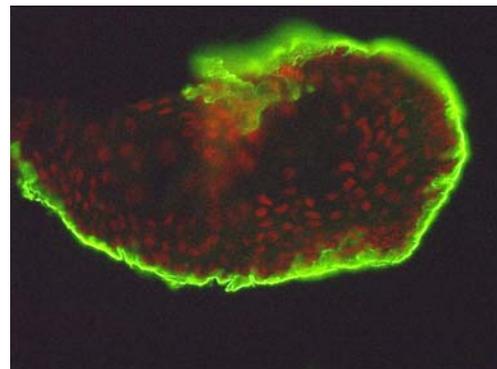
An der sich im Telogenstadium befindenden Haarzwiebel der mit **PROCAPIL™** behandelten Gruppe lässt sich eine stärkere Fluoreszenz der Epithelialscheide durch Laminin 5 beobachten.



Darüber hinaus lässt sich beobachten, dass die Markierung der sich im Telogenstadium befindenden Haarzwiebel durch Kollagen IV in der mit **PROCAPIL™** behandelten Gruppe ausgeprägter ist:



Placebo T4 Monate



PROCAPIL™ T4 Monate

Schlussfolgerung aus den Daten der *in vivo*-Studien

Die Ergebnisse der 4-monatigen Studie (der Dauer eines Telogenstadiums entsprechend) zeigen eine signifikante Abnahme ($p < 0,05$) der Haare im Telogenstadium in der mit **PROCAPIL™** behandelten Gruppe.

Dies stimmt vollkommen mit den morphologischen Beobachtungen an den bei einigen Probanden der mit **PROCAPIL™** behandelten Gruppe und der **PLACEBO**-Gruppe entnommenen Haaren überein:

Im Telogenhaar bildet sich wieder eine perfekt strukturierte Epithelialscheide mit einer einheitlichen und regelmäßigen Basalschicht, woraus eine gute Verankerung des Haares in der Dermis resultiert. Dies wird im Übrigen durch das Vorhandensein zahlreicher Adhäsionskomplexproteine - Kollagen IV und Laminin 5 - bestätigt.

Auf der Innenseite der Epithelialscheide lassen sich ebenfalls Adhäsionsstrukturen zwischen Haarschaft und Epithelialscheide erkennen.

4. ALLGEMEINE SCHLUSSFOLGERUNG

PROCAPIL™ ist ein sehr wirksamer Komplex gegen Haarausfall und fokussiert drei Angriffspunkte, die am Prozess des frühzeitigen Haarausfalls beteiligt sind:

- die 5- α Reduktase, die Testosteron in DHT umwandelt
- eine unzureichende Durchblutung
- die mangelnde Verankerung des Haares in der Haarpapille.

PROCAPIL™ setzt sich daher aus 3 Wirkstoffen zusammen, die gemeinsam in Aktion treten:

- Das Peptid Biotinyl-GHK aus der Gruppe der Matrikine, das durch die Stimulierung der Adhäsionsproteine auf die Verankerung des Haares wirkt
- Apigenin, ein Flavonoid aus Zitrusfrüchten mit gefäßerweiternder Wirkung
- Oleanolsäure aus der Wurzel von *Loveley hemsleya* (*Hemsleya amabilis*) das die Produktion von Dihydrotestosteron durch 5 α -Reduktase hemmt.

Die aus *in vitro*-Studien am menschlichen Haarfollikel und mittels Analyse der aktivierten Gene erhaltenen Daten haben Folgendes gezeigt:

- die Substantivität des Produkts auf den Haarschaft und seine selektive Lokalisierung
- eine verbesserte Morphologie des Haares mit einer voll funktionsfähigen und durch Adhäsionsproteine - Vimentin, Desmogleine, Desmokolline, Laminin 5 und Kollagen IV - gut strukturierten Epithelialscheide
- eine starke Vermehrungsaktivität der Keratinozyten und eine verstärkte Morphogenese der Haare.

Diese sehr positiven Eigenschaften zeigten *in vivo* ihre Wirksamkeit:

Im Rahmen einer 4-monatigen klinischen Studie (entsprechend der Dauer des Telogenstadiums) wird PROCAPIL™ mit Placebo verglichen und die Wirkung des Komplexes gegen Haarausfall bestätigt:

- Von 18 Probanden der PROCAPIL™-Gruppe zeigen 67% eine signifikante Verbesserung des Verhältnisses Anagen/Telogenphase ($p < 0,05$). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den publizierten Ergebnissen einer 5-monatigen oralen Finasteride®-Behandlung. Bei einigen Probanden verbessert sich das Verhältnis nach 4-monatiger Anwendung von PROCAPIL™ um mehr als 30% bzw. 46%.
- Die morphologische und immunhistologische Analyse der Telogenhaare, die zu Beginn und am Ende der Studie entnommen wurden, zeigt eine deutliche Verbesserung der Haarzwiebel, der Epithelialscheide und der Laminin 5- und Kollagen IV-Dichte in der mit PROCAPIL™ behandelten Gruppe.

Aus all diesen Ergebnissen läßt sich folgern, dass die Wirkung von PROCAPIL™ auf eine positive Beeinflussung der Verankerung des Telogenhaares in der Kopfhaut zurückzuführen ist. Die Regeneration der Epithelialscheide wird durch PROCAPIL™ gefördert. Auf diese Weise verlangsamt das Produkt den Haarausfall und verbessert den "Gesundheitszustand" der Haarfollikel.

Für eine optimale Wirkung empfehlen wir die Anwendung von PROCAPIL™ in einer Konzentration von 3%.

LITERATUR

ALMOND-ROESLER B et al, 1997

Cultured dermal papilla cells of the rat vibrissa follicle. Proliferative activity, adhesion and reorganization of the extra-cellular matrix *in vitro*.

Arch Dermatol Res., 289 (12), p698-704

ANDERSSON S., 2001

Steroidogenic enzymes in skin.

Eur J Dermatol., aug, 11 (4), p293-95

BAYNE EK. Et al, 1999

Immunohistochemical localization of types 1 and 2 5-alpha reductases in human scalp.

Br J Dermatol., sep, 141 (3), p481-91

BOYERA N. et al, 1997

Biphasic effects of Minoxidil® on the proliferation and differentiation of normal human keratinocytes).

Skin Pharmacol., 10, p206-20

COLIN A.B. et al, 1992

Cellular and extracellular involvement in the regeneration of the rat lower vibrissa follicle.

Development, 114, p887-97 (1992).

DALLOB AL. Et al, 1994

The effect of Finasteride, a 5 alpha reductase inhibitor, on scalp skin testosterone and DHT concentrations in patients with male pattern baldness.

J Clin. Endocrinol. Metab. , sep, 79 (3), p 703-6

FRIGG M et al, 1989

Clinical study on the effect of biotin on skin conditions in dogs

Schweiz. Arch. Tierheilk, 131, p 621-25

FRITSCHÉ A. et al, 1991

Pharmakologische Wirkungen von Biotin auf Epidermiszellen

Schweiz. Arch. Tierheilk, 133, p 277-83

GARROD et al, 2002

Desmosomal adhesion: structural basis, molecular mechanism and regulation.

Mol Membr Biol , Apr, 19 (2), p 81-94

GERST C et al, 2002

Type-1 steroid 5α - reductase is fonctionnally active in hair follicule as evidenced by new selective inhibitors of either type -1 or type -2 human steroid 5α -reductase

Exp Dermatol, 11, p52-8

HANAKAWA Y, 2002

Expression of desmoglein 1 compensates for genetic loss of desmoglein 3 in keratinocyte adhesion.

J Invest dermatol;, Jul, 119 (1), p27-31

JAHODA C. et al, 1992

Changes in fibronectin,laminin and type IV collagen distribution relate to basement membrane restructuring during the rat vibrissa follicle hair growth cycle.

J Anat, 181, p 47-60

JONAK C et al, 2002

Subcorneal colocalization of the small heat shock protein, HSP27, with keratins and proteins of the cornified envelope.

Br J Dermatol., Jul, 147 (1), p13-9

MAQUART FX, et al, 1999

Régulation de l'activité cellulaire par la matrice extracellulaire : le concept de Matrikines

Journal de la Société de Biologie, 193, (4), p 423

NUBER UA et al, 1996

Patterns of desmocollins synthesis in human epithelia: immunolocalization of desmocollin 1 and 3 in special epithelia and in cultured cells

Eur J Cell Biol, sep, 71 (1), p1.13

PAUS R., 1999

A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis.

The Society for Invest. Dermatol.

PHILPOTT MP, et al,

Whole Hair Follicle culture

Dermatologic Clinics, oct, 14 (4), p595-607

VAN NESTE D et al, 2000

Finasteride increases anagen hair in men with androgenetic alopecia.

British J of Dermatol., 143, p804-10

ROUSSELLE P., 2003

Laminine 5 et réparation de l'épiderme.

COBIP, Séminaire d'enseignement, LYON 2003

SAWAYA ME et al, 2001

Androgen responsive genes as they affect hair growth.

Eur J Dermatol., Aug, 11 (4), p304-8

SHELLEY W.B. et al, 1985

Uncombable hair syndrome: observations on response to Biotin and occurrence in sibs with ectodermal dysplasia.

J Am Acad Dermatol, 13 (97), p97-102

SUORMALA T. et al, 2002

Biotin-dependent carboxylase activities in different CNS and skin-derived cells, and their sensitivity to biotin-depletion.

Int J Vitam Nutr Res , 72 (4), p278-86

TAMIOLAKIS D. et al, 2001

Expression of laminin , type IV collagen and fibronectin molecules is related to embryonal skin and epidermal appendage morphogenesis.

Clin Exp Obstet Gynecol, 28 (3), p179-82

WARREN R. et al, 1992

Improved method for the isolation and cultivation of human scalp dermal papilla.

JJ Invest. Dermatol., 98 (5), p 693.

ANHANG**Für die klinische Studie verwendete Formulierung**

Inhaltsstoff	INCI-Bezeichnung	Lieferant	Placebo %	Produkt %
<u>Phase 1</u>				
Demineralisiertes Wasser	Water (<i>Aqua</i>)		qsp 100	qsp 100
Zitronensäure	Citric Acid		0,26	0,26
Trinatriumcitrat	Sodium Citrate		1,20	1,20
Incroquat CTC 30	Cetrimonium Chloride	Croda	1,00	1,00
<u>Phase 2</u>				
Ethanol	Ethanol		8,00	8,00
Parfum	Fragrance		qs	qs
Crillet 1	Polysorbate 20	Croda	0,40	0,40
<u>Phase 3</u>				
PROCAPIL™	(s. Zusammenfassung)	SEDERMA	-	3%
PROCAPIL™ Exzipient			3%	-

Cosmetic
ACTIVE INGREDIENTS

Sederma SAS

29, rue du Chemin Vert
F-78612 Le Perray en Yvelines
Tel ++ 33 1 34 84 10 10
Fax ++ 33 1 34 84 11 30
sederma@sederma.fr
www.sederma.fr

Sederma, Inc.

300-A Columbus Circle
Edison, NJ 08837 USA
Tel ++ (732) 692 1652
Fax ++ (732) 417 0804
sederma-usa@croda.com
www.croda.com

Sederma GmbH

Herrenpfad-Süd 33
41334 Nettetal Germany
Tel ++ 49 21 57 817318
Fax ++ 49 21 57 817361
sederma@sederma.de
www.sederma.fr



Sederma © 2004-2012

Member of Croda International Plc.