

## PROCAPIL™

### ZUSAMMENFASSUNG

**Beschreibung:** Kombination von 3 komplementären Wirkstoffen in Lösung.

**INCI-Bezeichnung:** Butylenglykol (und) Wasser (Aqua) (und) PPG-26-Buteth-26 (und) PEG-40 Hydriertes Rizinusöl (und) Apigenin (und) Oleanolisch Säure (und) Biotinoyl Tripeptid-1

#### **Objektiv nachgewiesene kosmetische Aktivität:**

▪ In vitroStudien:

- Studie zur Substantivität des Peptids Biotinyl-GHK am Haarfollikel - (BIOALTERNATIVES-Studie)
- Anti-Aging-Studie an kultivierten Haarfollikeln (BIO-EC-Studie): In Gegenwart von 2 ppm Biotinyl-GHK (dh 1 % PROCAPIL™) wurde in ähnlicher Weise ein überlegenes Wachstum gegenüber dem der Kontrolle (+58 %) erzielt. In Gegenwart von Minoxidil® 2 ppm (10 µM). Mit 5 ppm Biotinyl-GHK (dh 2,5 % PROCAPIL™) war das Wachstum 121 % größer als das der Kontrolle.
- Genaktivierung durch PROCAPIL-DNA (DNA-Array)

(BIOALTERNATIVES-Studie)

▪ In vivoStudien:

Placebokontrollierte klinische Studie über 4 Monate (DERMSCAN-Labors).

Die Ergebnisse der 4-monatigen klinischen Studie, die einen Zyklus der Telogenphase abdeckte, zeigten einen signifikanten Anstieg der Anagen/Telogen-Verhältnis vergleichbar mit der oralen Behandlung mit Finastéride® in der mit PROCAPIL™ behandelten Gruppe.

**Empfohlene Dosis für den Gebrauch : 3%**

**Sicherheit: zertifiziert im Rahmen der UNITIS-Charta**

Berichte auf Anfrage erhältlich:

Gutachten



DER CAM-Test

Menschen

Patch-Test am

RIPT

Ames-Test

## INHALT

<b>1. EINLEITUNG</b>	1 bis 7/41
<b>2. DAS KONZEPT ZUR VERZÖGERUNG VON HAARAUFSFALL</b>	8 bis 9/41
<b>3. WIRKSAMKEITSTESTS</b>	10 bis 35/41
<b>3.1. <i>In vitro</i> Studien</b>	
<b>3.1.1. Studien an kultivierten Haarfollikel-Explantaten</b> (Substantivität des Peptids Biotinyl-GHK auf dem Haarfollikel (BIOALTERNATIVES-Studie)	
<b>3.1.2. Anti-Aging-Studie an gezüchteten Haarfollikeln</b> (BIO-EC-Studie)	
<b>3.1.3. Genaktivierung durch PROCAPIL™</b> (BIOALTERNATIVES-Studie)	
<b>3.2. <i>In vivo</i> lernen</b>	
<b>Viermonatige placebokontrollierte klinische Studie (Laboratories DERMSCAN).</b>	
<b>FAZIT</b>	36 bis 37/41
<b>5. REFERENZEN</b>	38 bis 40/41
<b>ANHANG</b>	41/41

**03/2004 / V1**

## 1. EINLEITUNG

Haarausfall, Morgen für Morgen, bis schließlich der Haaransatz deutlich zurückgegangen ist: Das ist die Alltagserfahrung eines beträchtlichen Prozentsatzes der männlichen Bevölkerung. Nach der Sorge und Enttäuschung ermöglicht die Resignation dem Individuum schließlich, sich an ein wenig schmeichelhaftes Selbstbild anzupassen, bei dem die Glatze den gesamten Schädel mit Ausnahme der Hinterhauptzone betrifft.

Alopezie betrifft 20 % der Männer im Alter von 20 Jahren und nimmt pro Jahrzehnt um 10 % zu. Das bedeutet, dass mehr als die Hälfte der Männer im Alter von 50 Jahren unter Glatzenbildung leiden. Die Stärke der männlichen Nachfrage in diesem Kosmetiksegment ist leicht verständlich.

Alopezie, anfangs moderat, kann bei jungen Erwachsenen auftreten und hat in 95 % der Fälle eine androgene Ätiologie.

Vier Jahrhunderte vor Christus beobachtete Hippokrates, dass Eunuchen nie kahl wurden, und entdeckte so, dass Kahlheit von einem spezifisch männlichen Faktor abhängt.

Dieses androgenabhängige Phänomen erklärt auch, warum Frauen weniger unter Glatzenbildung leiden. Das Handicap tritt nur unter bestimmten Umständen auf, wie z. B. bei Krankheit, Stress oder manchmal in der Perimenopause, wenn die Östrogene abrupt abfallen und das zirkulierende Testosteron nicht mehr ausgleichen.

Diese Ungleichheit von Männern und Frauen rettet letztere, wobei weniger als 1% über übermäßigen Haarausfall oder etablierte Kahlheit klagen.

Ein weiterer Unterschied spricht für Frauenhaare: Die Lebenserwartung ist mit bis zu 7 Jahren deutlich höher, während sie im Durchschnitt nur halb so hoch ist wie bei Männerhaaren. Dies erklärt die große Länge, die das Haar einer Frau erreichen kann.

Der Haarwachstumszyklus ist jedoch bei beiden Geschlechtern gleich und besteht aus 3 aufeinanderfolgenden Phasen:

Jedes Haar wird auf der Ebene einer dermalen Papille gebildet, die durch die Zellteilung von Keratinozyten eine Haarzwiebel und dann ein eigentliches Haar ergibt.

Einer „inneren Uhr“ folgend, erhält jede Papille, die sich an der Basis des Haarfollikels befindet, eine Wachstumsnachricht, die notwendig ist, um den Zyklus der natürlichen Erneuerung des Haares auszulösen.

- Die erste Phase oder Wachstumsphase wird als Anagen bezeichnet und dauert im Durchschnitt 3 bis 4 Jahre.
- Die zweite Phase besteht aus einer Unterbrechung des Wachstums über 2 bis 3 Wochen. Das ist das Katagen.
- Die dritte Phase ist das Telogen, wenn die Haare ausfallen. Dies erfolgt ziemlich langsam, da es eine Regression der bulbären Zone und ein Ablösen des Haarschafts (der sich in der Unterhaut in einer Tiefe von etwa 1,5 mm befindet) vor dem Ausstoßen zur Oberfläche erfordert. Die Dauer beträgt etwa 3 bis 4 Monate.

Der Zyklus wiederholt sich etwa 25 Mal im Leben.

- **Morphogenese des Haares**

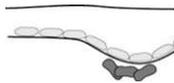
Haare oder Körperbehaarung entstehen durch die Wechselwirkung zwischen Dermis und Epidermis.

Induziert durch eine epidermale Botschaft organisieren die Fibroblasten ein Signal und leiten es an Keratinozyten weiter, was die Bildung einer epidermalen Platte (1) induziert, die sich in die Dermis einstülpt, um eine Primärknospe (2) zu bilden.

Die primäre Knospe sendet ihrerseits Botschaften aus, die die umgebenden Fibroblasten stabilisieren, um die zukünftige dermale Papille zu bilden (3).

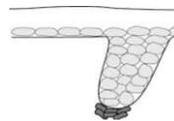
Schließlich differenziert sich die Knospe allmählich (4 und 5) zu einem Haarfollikel unter dem Einfluss der Botschaften, die von der dermalen Papille gesendet werden.

Die verschiedenen Phasen der Morphogenese eines Haares nach PAUS, 1999



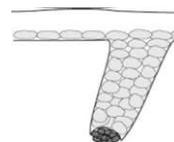
Aufbau der Epidermisplatte nach einem Signal der Keratinozyten

Stufe 1



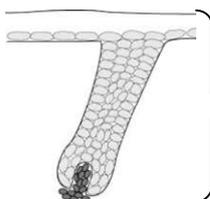
Einstülpung der Plakode in der Dermis mit Ausbildung der Primärknospe

Stufe 2



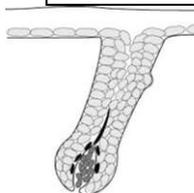
Beginnende Bildung der dermalen Papille nach einem Signal der Fibroblasten

Stufe 3



Differenzierung: Bildung des Haarfollikels als Reaktion auf ein Signal der Hautpapille

Stufe 4



Stufe 5

Zahlreiche Botenstoffe interagieren in diesem dermal-epidermalen Dialog und ihre genauen Rollen müssen noch aufgeklärt werden.

▪ **HAARE UND DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX**

Ein wesentlicher Bestandteil des Haarwachstums ist die physikalische Wechselwirkung zwischen Dermis und Epidermis innerhalb der dermalen Papille, wo Keratinozyten und Fibroblasten kondensiert sind.

Die dermale Papille ist eine Zone, die besonders reich an Kollagenen und Glykosaminoglykanen ist, die den engen Kontakt zwischen den beiden Zellpopulationen aufrechterhalten und die für das Wachstum des Haarschafts notwendige chemische Kommunikation fördern. Die Bedeutung von Kollagen IV und Laminin muss betont werden, da diese Matrixkomponenten auch die Basalmembran der dermoepidermalen Verbindung und einen Großteil der dermalen Papille (mit Fibronectin) bilden, die als Matrixmotor für das Haarwachstum angesehen werden kann (JAHODA et al., 1992), (ALMOND-ROESLER B. et al., 1997).

Die zentrale Rolle, die Grenzflächenmatrixmoleküle beim Wachstum und der Differenzierung der Haut und ihrer Anhängsel spielen, wird durch die Arbeit von TAMIOLAKIS (2001) zur Embryogenese der menschlichen Haut deutlich.

Die Immunfluoreszenzmarkierung zwischen der 12. und 21. Woche zeigt die starke Konzentration von Laminin, Kollagen IV und Fibronectin in der Wurzelscheide des Haarschafts.

Die zunächst nur in den epithelialen Keimzellen der Haarzwiebel (Woche 12) vorhandenen Verbindungen dringen allmählich in die Wurzelscheide ein und wandern dann in den Bereich, wo das Haar austritt, und zum dermoepidermalen Übergang (DEJ in Woche 21).

Im Anfangsstadium, vor der 12. Woche, ist auf der Höhe der dermoepidermalen Basallamina Vimentin vorhanden und es bilden sich die ersten Hemidesmosomen (Woche 8–9).

Die Bedeutung der Matrixkomponenten für das Überleben und Wachstum kultivierter menschlicher Haarfollikel wurde auch von WARREN R. et al., 1992, demonstriert.

Die Rolle der Grenzflächenmatrixproteinewird besonders deutlich in der Abfolge von Ereignissen dargestellt, die zur Wiederherstellung eines neuen Haares führen. Wenn der Bulbus künstlich geschnitten und entfernt wurde, wandern die Keratinozyten der äußeren Wurzelscheide unter die beeinträchtigte Zone. Fibroblasten entfalten sich gegenüber den Keratinozyten. In dieser neuen Grenzflächenzone wird eine Matrix aus Kollagen IV, Laminin 5 und Fibronectin gebildet. Eine neue dermale Papille wird gebildet und in Betrieb genommen (COLIN et al., 1992).

Es sollte beachtet werden, dass Kollagen IV und Laminin 5 hauptsächlich von synthetisiert werdenKeratinozyten und dass Laminin 5 eine entscheidende und unersetzliche Rolle bei der dermoepidermalen Kohäsion und bei der Migration von Keratinozyten während der Narbenbildung spielt (ROUSSELLE P., 2003).

- **HAARE UND MÄNGEL**

Biotin oder Vitamin H ist ein essentielles Vitamin, das dem Körper über die Nahrung zur Verfügung gestellt wird.

Biotinmangel führt zu Anomalien der Haut und Anhängsel: feines, „unkämmbares“ Haar (SHELLEY et al., 1985), Haarausfall, Schuppung, Pruritus und Dermatitis (FRIGG et al., 1989; FRITSCHE et al., 1991).

Zu den Zellen, die am empfindlichsten auf Biotinmangel reagieren, gehören Neuronen und Keratinozyten (SUORMALA et al., 2002). Physiologische Mängel beim Menschen führen zu geistiger Behinderung und Hautanomalien. Angesichts des gemeinsamen embryologischen Ursprungs von Haut und Gehirn ist dies nicht ganz unerwartet.

In der Epidermis reguliert Biotin insbesondere die Bildung der späten Cytokeratine der Differenzierung (FRITSCHÉ et al., 1991).

Aus biochemischer Sicht ist Biotin ein enzymatischer Cofaktor, der für den korrekten Betrieb von mitochondrialen Carboxylasen, für die es die prosthetische Gruppe darstellt, unverzichtbar ist.

Kovalent an Lysinreste von mitochondrialen Enzymen (Pyruvat-, Propionyl-CoA-, 3-Methylcrotonyl-CoA- und Acetyl-CoA-Carboxylasen) gebunden, ermöglicht Biotin, umgewandelt in seine aktive Form, Carboxybiotin, die Übertragung von CO<sub>2</sub>-Gruppen auf Akzeptoren wie Pyruvat (Krebs 'Zyklus) und Oxalacetat (Lipogenese): Biotin ist somit ein entscheidender Cofaktor im mitochondrialen Stoffwechsel.

#### ▪ STRATEGISCHE ZIELE ZUR VERLANGSAMUNG DES HAARVERLUSTS

##### **Erstes Ziel**

Das erste Ziel ist offensichtlich androgen: Ziel ist es, die Produktion von Dihydrotestosteron (DHT) um 5 zu verlangsamen-Reduktase. Dieser Metabolit ist aktiver

als Testosteron (über das Blut zugeführt), da es eine größere Affinität zu den Androgenrezeptoren hat, die sich insbesondere auf der dermalen Papille befinden (ANDERSSON S., 2001).

DHT wirkt durch Atrophie des Haarfollikels und gemäß einer kürzlich vorgebrachten Hypothese (SAWAYA et al., 2001) durch einen proapoptischen Mechanismus über Caspase 3.

In der Haut sind jedoch zwei Isoformen der 5 $\alpha$ -Reduktase vorhanden  $\alpha$ 1-Form scheint auf Gesichtsebene (vgl. Akne) und in den Haarfollikeln auf Höhe der

Hautpapillen aktiver zu sein, während die  $\alpha 2$ -Form soll stärker auf der Ebene der inneren und äußeren Wurzelscheide vorhanden sein (BAYNE et al., 1999). Das Team von L'Oréal (GERST, 2002) zeigte in einer Struktur/Aktivitäts-Beziehungsstudie, dass die spezifischen Inhibitoren von  $\alpha 2$ -Reduktase waren auf kultivierten Haarfollikeln im Gegensatz zu spezifischen nicht aktiv  $\alpha 1$ -Reduktasen oder gemischta1- und  $\alpha 2$ -Reduktasen.

Die Verwendung einer gemischten  $5\alpha 1$ - und  $5\alpha 2$ -Reduktase-Hemmer wie Finasterid (ein ursprünglich für Prostatahypertrophie entwickeltes Medikament wegen seiner Wirkung auf  $5\alpha 2$ -Reduktase) ermöglichte eine deutliche Reduzierung des Haarausfalls bei Patienten mit deutlich zurückgegangenem Haaransatz.

So wurde nach 1 Jahr durch einfache Hemmung von  $5\alpha$  eine 47%ige Zunahme der Haare in der Anagenphase erreicht (VAN NESTE et al., 2000).

Dieser Effekt wird auf eine lokale Abnahme des DHT-Spiegels (50 %) zurückgeführt. DHT ist somit in der Konzentration vorhanden, die in normaler Kopfhaut gefunden wird (DALLOB et al., 1994).

### **Zweites Ziel**

Das zweite Ziel ist das Blut: Gute Kapillardurchblutung ist der Mechanismus, der zur Erklärung des unerwarteten Erfolgs eines peripheren Vasodilatators, Minoxidil®, der ursprünglich als Antihypertensivum verwendet wurde, entwickelt wurde. Seine interessante Nebenwirkung, frisches Haarwachstum, wurde durch die klinische Anwendung des Medikaments zur Behandlung von Bluthochdruck entdeckt.

Während die Wirkung im Zusammenhang mit einer verbesserten Kapillarperfusion nicht minimiert werden sollte, ist jetzt bekannt, dass Minoxidil® auch wirkt, indem es die aktive Proliferation der bereits differenzierten Keratinozyten im Follikel aufrechterhält (BOYERAN, 1997).

**Drittes Ziel**

Zusätzlich zu der hyperproliferativen Wirkung von Minoxidil® (Konzentration unter 100 µM) wurde eine differenzierungsfördernde Wirkung bei einer höheren Dosis (in der Größenordnung von einem Millimol) berichtet. Dieser Effekt kann bei einer Langzeitbehandlung mit lokaler Akkumulation in den Follikeln erreicht werden. Dadurch wird der Haarausfall verzögert. Die hyperproliferative und differenzierungsfördernde Wirkung bilden somit das 3. Target.

**2. DAS KONZEPT ZUR VERZÖGERUNG VON HAARVERLUST**

Auf der Grundlage des derzeitigen Verständnisses der Morphogenese von Haaren und der fortschreitenden Entdeckung der potenziellen Ursachen, die Alopezie auslösen oder verschlimmern, ist klar, dass ein hochkomplexer und multifaktorieller Mechanismus beteiligt ist. Der Versuch, die Entstehung des Follikels und das Fortschreiten des Haarwachstumszyklus zu kontrollieren, kommt daher einer Wette gleich.

Darüber hinaus haben jüngste genetische Studien eine beträchtliche Anzahl von Genen (mindestens 5) gezeigt, deren Mutationen Folgen in Bezug auf Alopezie haben (SEDGWICK John, GQ Magazine, 1999).

Es erscheint daher wichtig, diese nicht zu vernachlässigen die bereits erzielten Fortschritte, insbesondere in Bezug auf die antiandrogenen und gefäßerweiternden Komponenten:

wählte daher zwei Wirkstoffe pflanzlichen Ursprungs aus, die auf diese Targets wirken: Oleanolsäure (aus Olivenbaumblättern extrahiert) zur Hemmung von 5α1- und 5α2-Reduktasen und Apigenin (aus Zitrusfrüchten extrahiertes Flavonoid) zur Vasodilatation.

stärkte dann diese beiden Ansätze mit einer gezielten Aktion zum Konzept der Haarverankerung:

Wenn wir in der Lage sind, eine bessere „Verwurzelung“ der Haare in der Haut zu gewährleisten, wird eine verbesserte Haftung (dermale Papille – Haarfollikel) mit einem verbesserten Austausch von chemischen Botenstoffen auf Grenzflächenebene erreicht. Diese verbesserte Schnittstelle wird sich positiv auf die Qualität und Dauer der Anagenphase auswirken. In ähnlicher

Weise sollte eine verbesserte Verankerung der Haarscheide und Dermis den Beginn der Telogenphase verzögern.

Zu diesem Zweck wählten wir eine Peptidsequenz aus, die mit pro-matrizialen Aktivitäten ausgestattet ist: das Peptid Glycyl-Hystidyl-Lysin, ein Mitglied der Matrikines-Reihe (MAQUART et al., 1999), und banden es an Vitamin H (Biotin). Ein Mangel an diesem Vitamin führt zu feinem, alopezischem Haar, schlaffer Haut und Dermatitis.

So wurde eine neue Einheit geschaffen: Biotinyl-GHK, ein Vitamin-tragendes Peptid, mit der Erwartung einer dualen matrizialen und metabolischen Wirkung. So wurden in dem neuen Konzept drei Wirkstoffe, Oleanolsäure zur Hemmung der 5a-Reduktase, Apigenin zur Verbesserung der Durchblutung und Biotinyl-GHK zur verstärkten Verankerung der Haare bei verstärktem Wachstum, kombiniert:

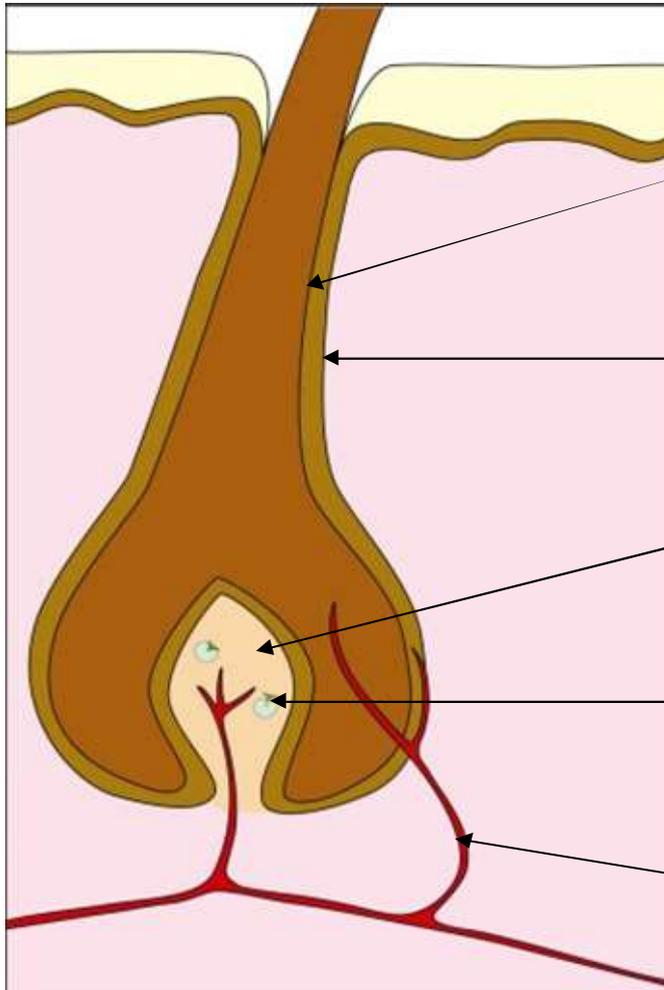
## PROCAPIL™

Biotinyl-  
GHK → Innere  
Wurzelscheide

Biotinyl-  
GHK → Äußere  
Wurzelscheide

Biotinyl-  
GHK → Dermale  
Papille

### Ziele der PROCAPIL™-Verbindung



Gegenstand dieses  
Dossiers sind der

Oleanolsäure →  
5- $\alpha$ -Reduktase-  
Antagonismus

Apigenin → Vasodilatation

Wirkungsmechanismus, bestätigt durch die Aktivierung bestimmter Gene (DNA-Array), Matrix-Stärkungseffekte, Wachstum menschlicher Haarfollikel-Explantate in Kulturen und Ergebnisse einer 4-monatigen placebokontrollierten klinischen Studie.

### 3. WIRKSAMKEITSTESTS

#### 3.1. In vitro Studien

### **3.1.1. Studie über kultivierte Haarfollikel-Explantate (Substanz des Peptids Biotinyl-GHK am Haarfollikel - BIOALTERNATIVES-Studie)**

#### Prinzip

Die Studie wurde an menschlichen Hautexplantaten (Bauchplastik) durchgeführt, die in PBS-Medium in einer feuchten Kammer bei 21 °C kultiviert wurden.

Nach der Inkubation der Explantate mit dem Peptid wurde eine immunhistochemische Untersuchung der Schnitte durchgeführt, um die selektive Lokalisierung des Produkts um die Pilialzone herum zu untersuchen.

#### Protokoll

Hautexplantate (mit Haarfollikeln) wurden in Gegenwart von 60 ppm Peptid für 18 Stunden inkubiert und mit Kontrollexplantaten verglichen, die dem peptidfreien Exzipienten ausgesetzt waren.

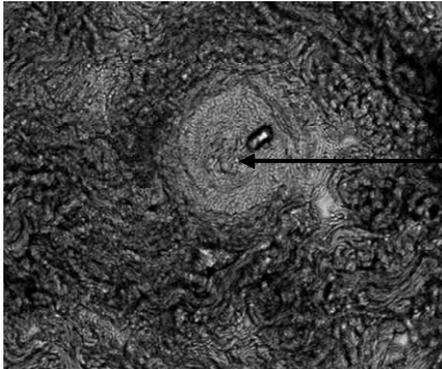
Die Bestimmungen wurden dreifach durchgeführt.

Nach 18 Stunden wurde eine 8-mm-Biopsie aus der Mitte jeder Vertiefung entfernt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

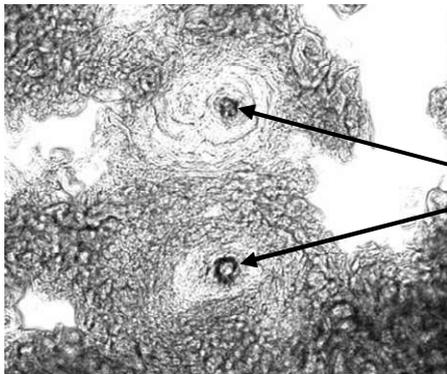
Die 15 mm dicken Schnitte wurden mit einem Gefriermikrotom (Kryostat) angefertigt, anschließend getrocknet und fixiert. Biotinyl-GHK wurde durch Immunmarkierung gekoppelt mit Streptavidinperoxidase nachgewiesen.

## Ergebnisse

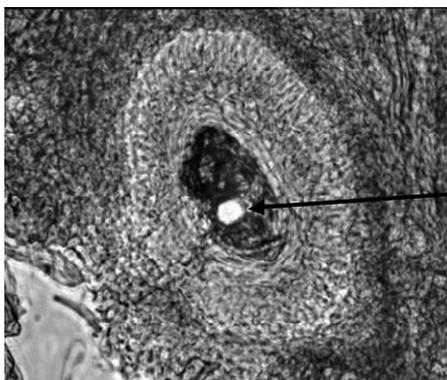
Die Schnitte zeigten die klare peripiliäre Lokalisation des Peptids Biotinyl-GHK.



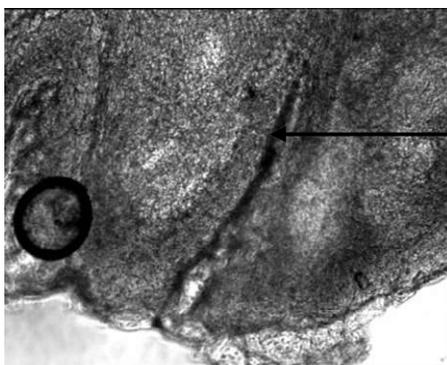
**E:** Bild des Kontrollexplantats: nein Beschriftung um den Haarschaft (Vergrößerung 20X)



**B:** eindeutige Lokalisierung von Biotinyl-GHK um 2 benachbarte Haarschäfte (Vergrößerung 20X)



**C:** mit 40-facher Vergrößerung, das Peripheriegerät konzentrische Zone des Haares ist stark markiert durch Biotinyl-GHK



**D:** Längsschnitt, spezifisch Lokalisierung von Biotinyl-GHK mit gut Verteilung entlang der Haarlänge und keine Markierung des umgebenden Gewebes (Vergrößerung 20X)

## Fazit

Biotinyl-GHK ist ein substantives Peptid, das eine spezifische Lokalisierung um sein Ziel herum aufweist: den Haarfollikel.

### 3.1.2. Anti-Aging-Studie an gezüchteten Haarfollikeln (BIO-EC-Studie)

#### Prinzip

Die überschüssigen Haarfollikel, die im Zusammenhang mit einer Mikrotransplantat-Transplantationssitzung präpariert wurden, wurden zur Kultivierung in einem Medium ähnlich dem von PHILPOTT et al., 1996, gesammelt.

T0
----

#### Protokoll

Die Haarfollikel wurden einzeln bei 37°C unter einer Atmosphäre aus Luft plus CO<sub>2</sub> (5 %) für 14 Tage inkubiert.

Die Explantate wurden in verschiedene Gruppen eingeteilt: Kontrollgruppe im Kulturmedium allein, positive Kontrollgruppe (positives Referenzprodukt) und Testgruppe, die Peptid-Biotinyl-GHK ausgesetzt war.

Die Kulturmedien wurden alle 2 Tage gewechselt.

Die allgemeine Morphologie wurde an D0 und D14 beobachtet.

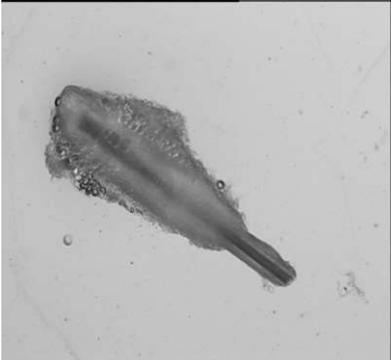
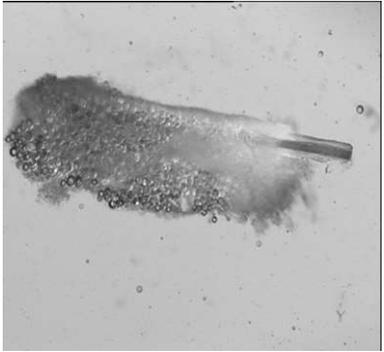
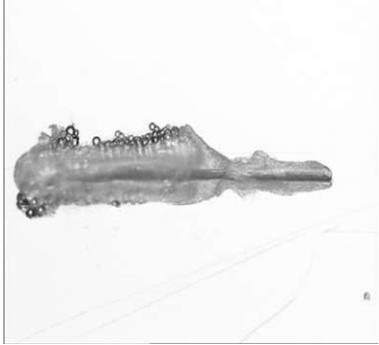
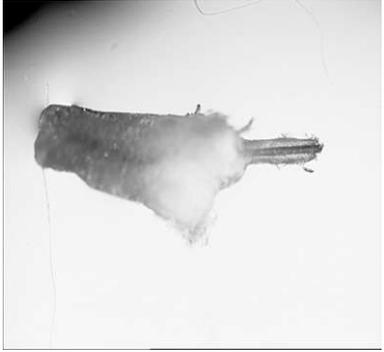
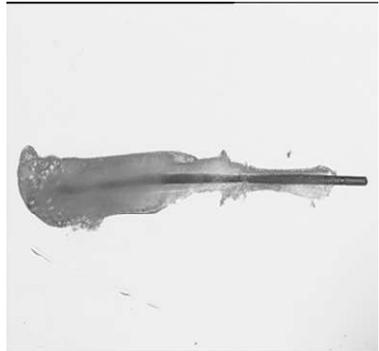
Gleichzeitig wurde ein Bruchteil der Follikel eingefroren, um fortgeschrittenere immunhistochemische Studien durchzuführen.

Das Wachstum wurde unter Verwendung einer Digitalkamera mit Bildern überwacht, die an D0, D3, D5, D7, D11 und D14 aufgenommen wurden.

#### Ergebnisse der allgemeinen Morphologie

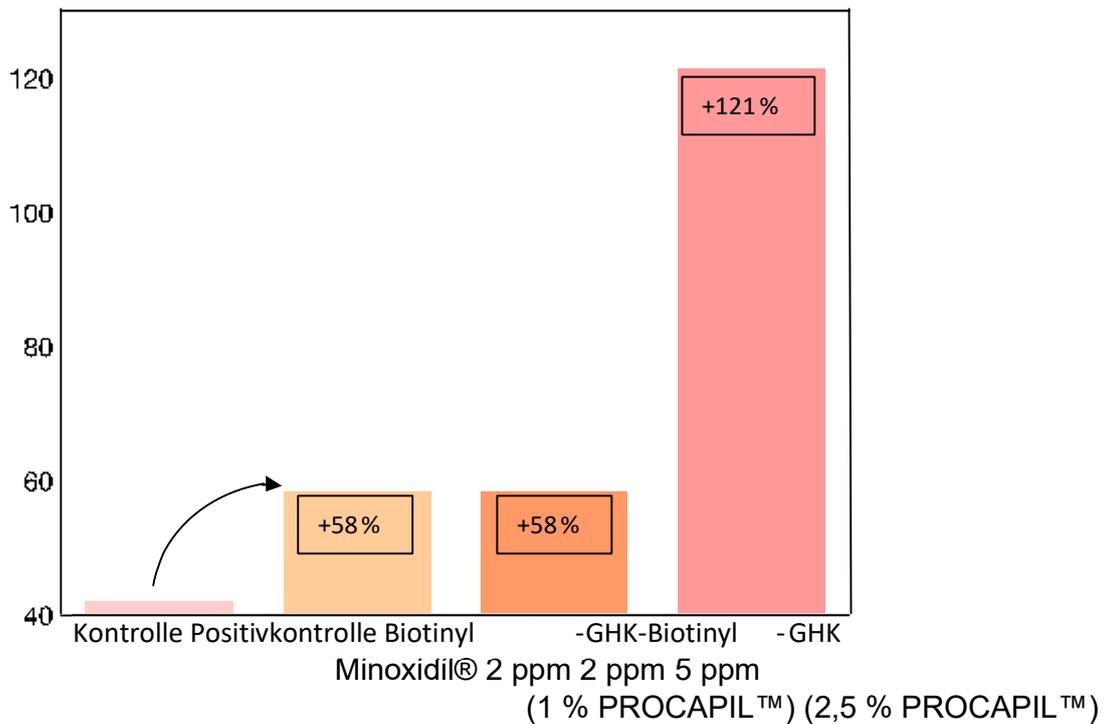
##### **1-Wachstum des Haarschafts**

Die Wachstumsbestimmungen wurden am freien Teil des Haarschafts (ohne den unteren Teil der Haarzwiebel) durchgeführt.

Wachstum des Kontrollfollikels, Tage T0 bis T14	Wachstum des Follikels, der Biotinyl-GHK ausgesetzt war, Tage T0 bis T14	
		
		T7
		T14

Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Grafik dargestellt:

Haarschaftwachstum von D0 bis D14 (%)



## Fazit

Unter Einwirkung von 2 ppm Peptid (dh 1 % PROCAPIL™) wurde 58 % mehr Wachstum als bei der Kontrolle erzielt, und das Wachstum war ähnlich dem, das in Gegenwart von 2 ppm Minoxidil® (10 µg/ml) beobachtet wurde. Mit 5 ppm BiotinylGHK (dh 2,5 % PROCAPIL™) war das Wachstum 121 % größer als das der Kontrolle.

## **2. Anti-Aging-Wirkung auf die Wurzelscheide**

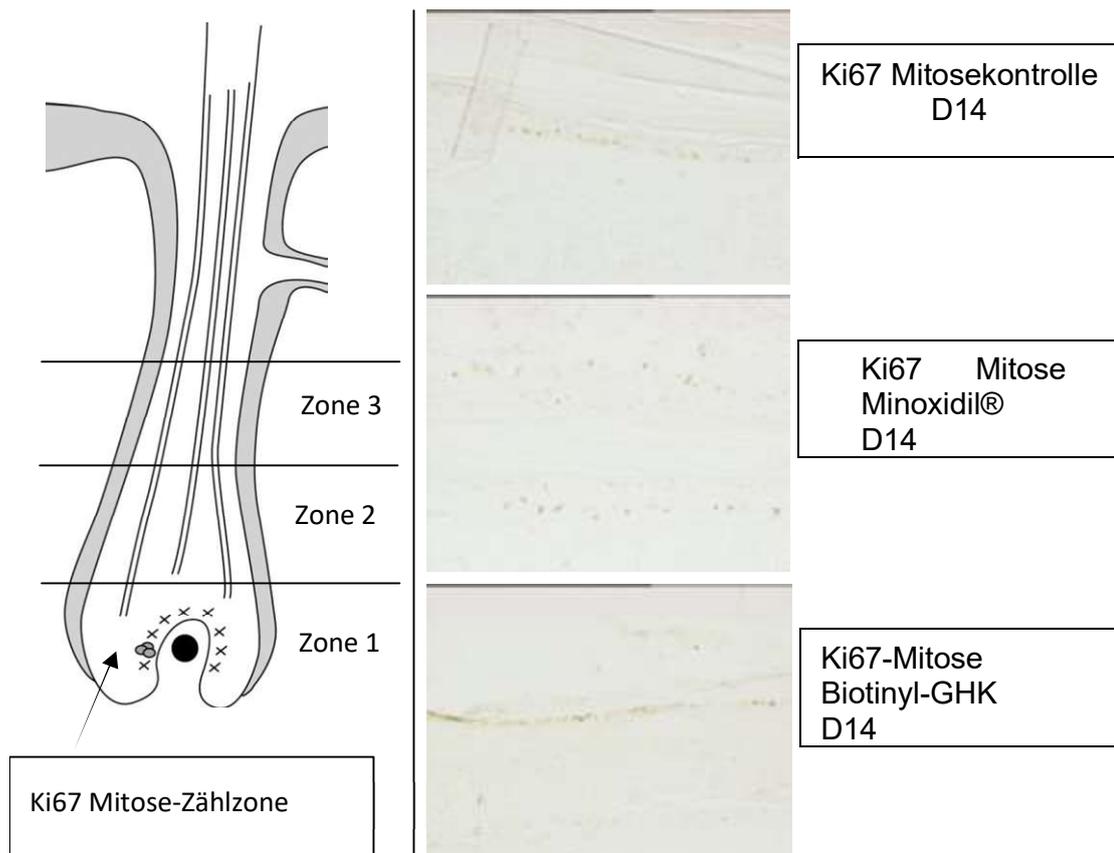
### Prinzip

Der mitotische Marker Ki67 wurde verwendet, um die Zellwachstumsaktivität nachzuweisen.

### Protokoll

Gefriermikrotomschnitte wurden an D0 und D14 angefertigt und Peroxidasegebundenem Anti-Ki67-Antikörper ausgesetzt.

Auf den Schnitten wurden die sich teilenden Zellen dunkelbraun gefärbt. Unter dem Mikroskop wurde der untere Abschnitt der Wurzelscheide des Haarschafts ausgezählt. Alle Zellen, die den Ki67-Marker zeigten, wurden gezählt (Zone 1).



### Ergebnisse

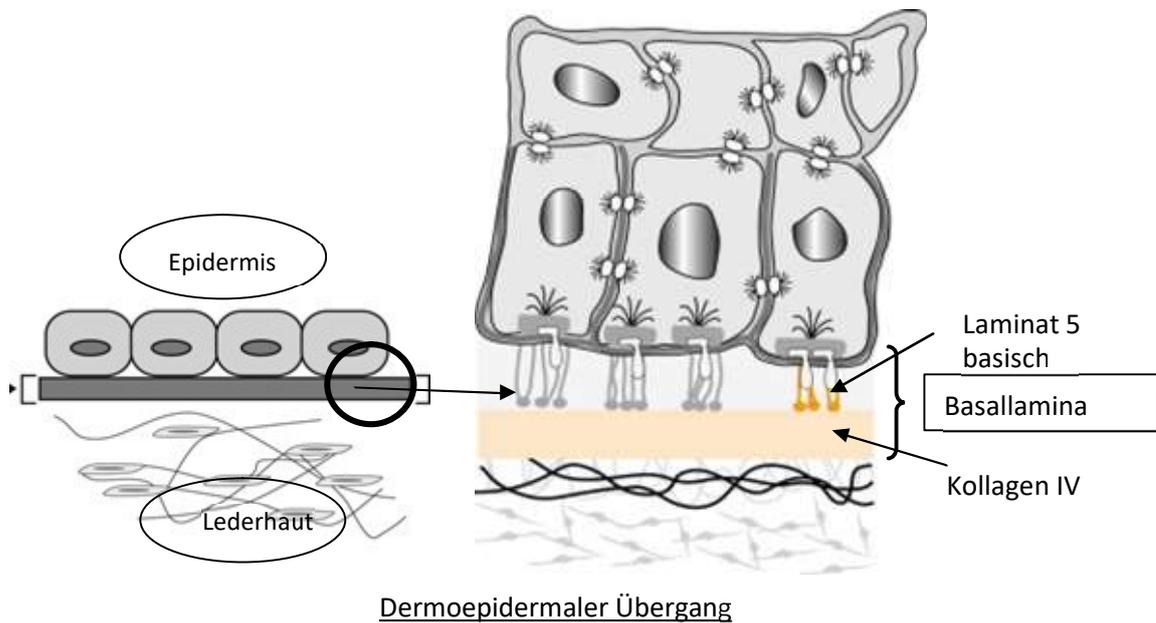
Für die Kontrollzwiebel zeigten die Ergebnisse eine Abnahme der mitotischen Keratinozyten am Tag 14 der Kultur, was die Zellalterung widerspiegelt.

Minoxidil® behielt die proliferative Aktivität bei (wie von BOYERA et al., 1997 berichtet), ebenso wie 0,3  $\mu\text{M}$  Biotinyl-GHK (2 ppm) und ungefähr 1  $\mu\text{M}$  (5 ppm) Biotinyl-GHK. Die mit Biotinyl-GHK erzielte Wirkung war dahingehend überlegen, dass sie bei Konzentrationen erhalten wurde, die 10- bis 30-mal niedriger waren als die Minoxidil®-Konzentration, 10  $\mu\text{M}$  (2 ppm).

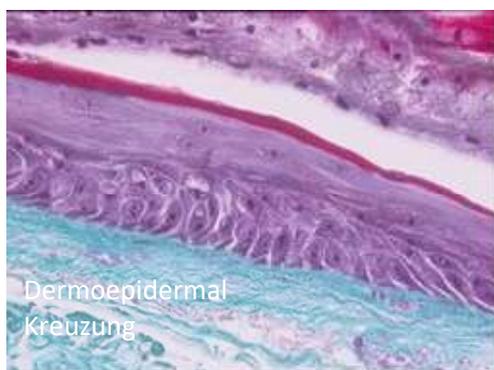
### **3. Stimulation der Adhäsionsproteine der Wurzelscheide u dermale Papille**

#### Prinzip

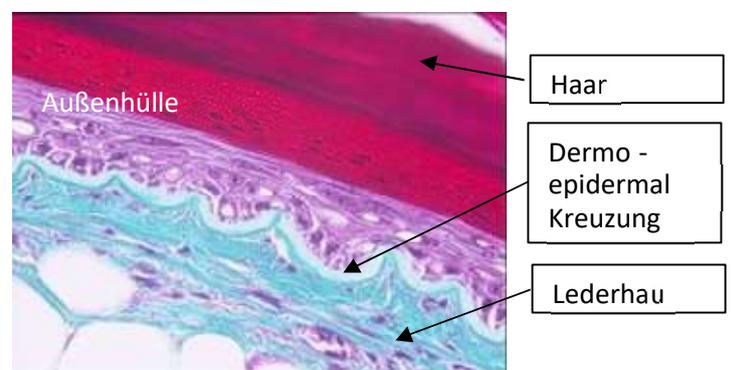
Die Qualität der dermoepidermalen Verbindung hängt von der Bildung einer sehr dichten Basallamina ab, die reich an Laminin 5 und Kollagen IV ist, auf der die Keratinozyten der ersten Basalschicht ruhen und an der sie haften.



a) Die morphologische Beobachtung nach 14 Tagen Kultivierung zeigte bei der Kontrolle eine dermoepidermale Verbindung auf der Seite der äußeren Hülle, die abgeflacht war und ihre Basallamina verloren hatte. Wenn der Haarfollikel im Gegensatz dazu 14 Tage lang mit Biotinyl-GHK inkubiert wurde, blieb die Basallamina bestehen und war deutlich gezeichnet, was ihren sinusförmigen Charakter zeigte. Diese beiden Befunde spiegeln eine stark anhaftende und lebende dermoepidermale Verbindung wider.



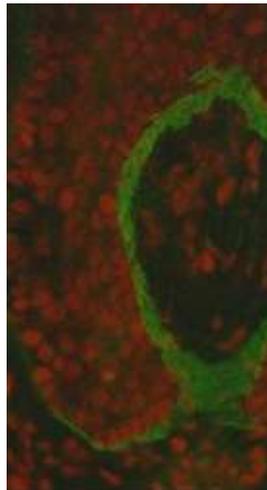
Kontrolle: 14 Tage



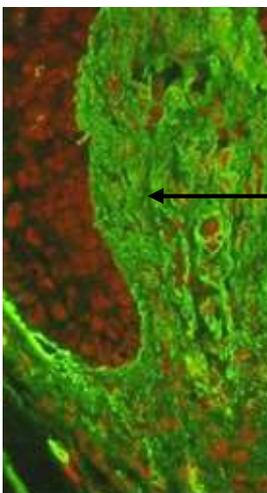
Behandelt: 14 Tage

b) Laminin 5 und Kollagen IV sind zwei Proteoglykane von entscheidender Bedeutung beim Aufbau der Basalmembran, der Befestigungszone für die Epidermis und Dermis und im Fall von Haaren zwischen der Wurzelscheide und der Dermis. Die Matrixkomponenten können auf histologischen Schnitten durch Immunmarkierung nachgewiesen werden.

Laminin 5 und Kollagen IV sind auch stark in der dermalen Papille vorhanden (JAHODA et al., 1992), wie durch die Kontrollschnitte gezeigt wird, die an D0 unter Verwendung von gezüchteten Haarfollikeln hergestellt wurden.



Laminin 5 in der inneren Wurzelscheide, Schnittstelle zur dermalen Papille



Kollagen IV in der inneren Wurzelscheide und in der dermalen Papille

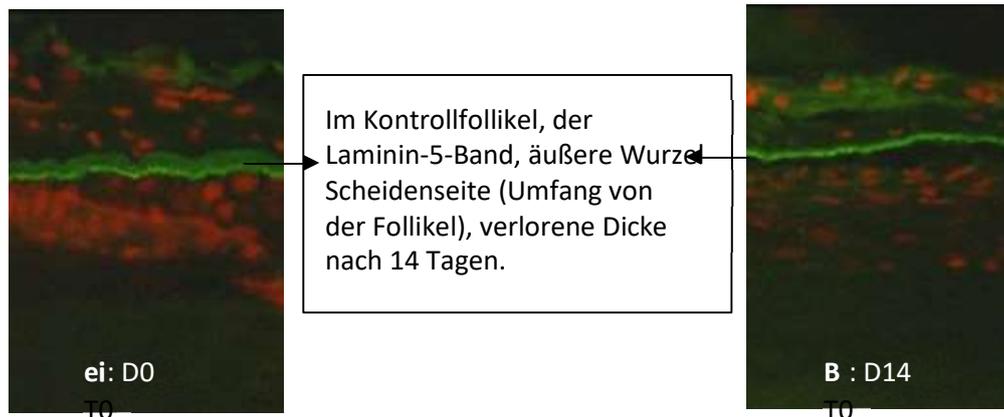
### Protokoll

Die Gefriermikrotomschnitte der D0- und D14-Proben wurden fluoreszierenden Antikörpern ausgesetzt, die für Laminin 5 (Tebu) und Kollagen IV (Cliniscience) spezifisch sind. Die erhaltene Färbung besteht aus grüner Fluoreszenz. Gegenfärbung der Kerne wurde unter Verwendung von Propidiumiodid durchgeführt, was eine rote Färbung ergab.

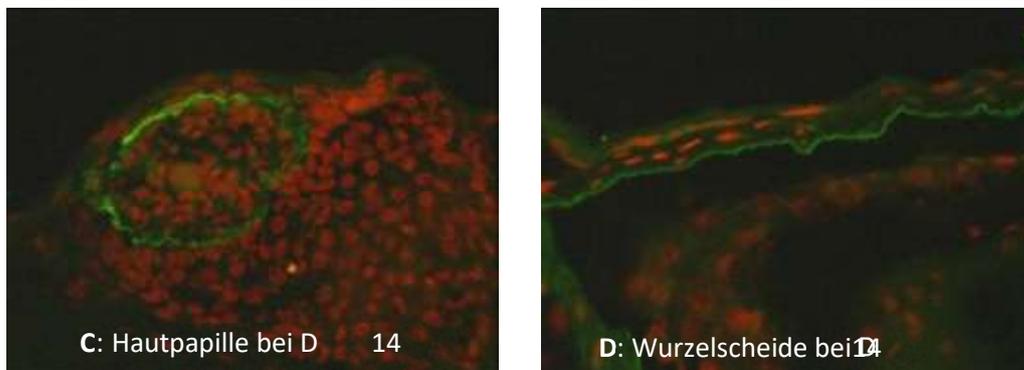
Die Beobachtungen wurden an der unteren Zone des Follikels oberhalb und unterhalb des Bulbus durchgeführt (Zone 1 und 2, vgl. Diagramm Seite 15).

## Ergebnisse

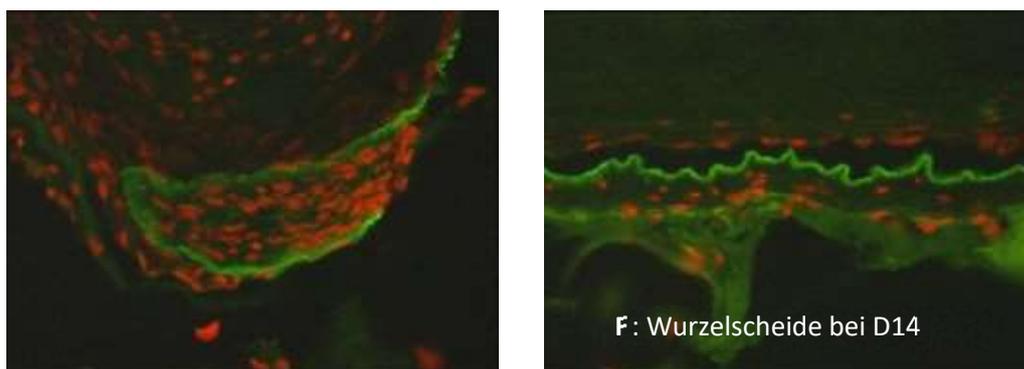
### a) Laminin 5



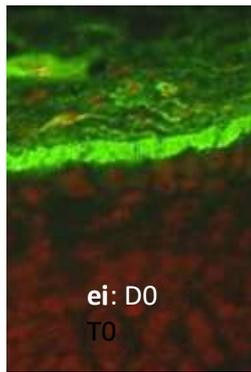
Dies veranlasste uns, den Verlust von Laminin 5 in Gegenwart der verschiedenen Produkte am Tag 14 zu untersuchen.



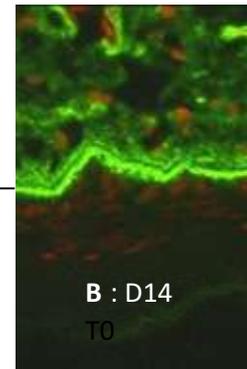
Nach der Exposition gegenüber 2 ppm (10  $\mu$ M) Minoxidil® zeigte der Follikel eine Laminin-5-Bande, die nach 14 Tagen dick und streifenförmig blieb



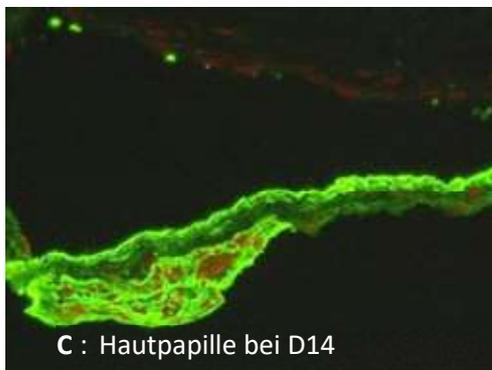
Nach Exposition gegenüber 2 ppm (0,3  $\mu$ M) Biotinyl-GHK blieb Laminin 5 nach 14 Tagen stark auf Papillenhöhe und in der äußeren Wurzelscheide vorhanden

**B) Kollagen IV**

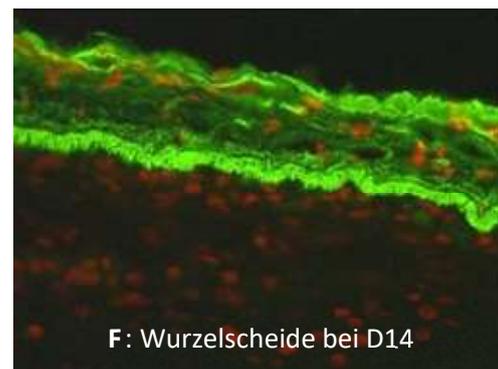
Bei der Kontrolle hat sich die bei T0 sehr dicke Kollagen-IV-Bande destrukturiert und an T14-Tagen an Dichte verloren. Der Papille verlor ihre Beschriftung (Fotos nicht gezeigt)



Dies veranlasste uns, den Kollagen-IV-Verlust am Tag 14 in Gegenwart der verschiedenen Produkte zu untersuchen.



Die Exposition gegenüber 2 ppm (10  $\mu$ M) Minoxidil® induzierte nach 14 Tagen einen Verlust der IV-Kollagendichte in der dermalen Papille und in der Wurzelscheide.



In Gegenwart von Biotinyl-GHK blieb Kollagen IV nach 14 Tagen stark in der dermalen Papille (e) vorhanden und war auf Höhe der Wurzelscheide sehr dick und strukturiert (f). Die beobachtete Struktur ist fast dieselbe wie die der Kontrolle bei D0 (a).

## **Fazit**

**Die schützenden und reparierenden Wirkungen des Peptids Biotinyl-GHK auf die Bestandteile der Wurzelscheide und der Hautpapille, Kollagen IV und Laminin 5, wurden eindeutig nachgewiesen. Bei Haarfollikel-Explantaten, die über 14 Tage kultiviert wurden, waren die beobachteten Wirkungen ausgeprägter als diejenigen, die durch Minoxidil® bei 30-fach niedrigeren Biotinyl-GHK-Konzentrationen induziert wurden.**

**In Bezug auf die allgemeine Morphologie ist Biotinyl-GHK mit einer sehr ausgeprägten Anti-Aging-Aktivität auf Haarfollikel-Keratinocyten (14-Tage-Kultur) mit Aufrechterhaltung einer lebensfähigen Wurzelscheide (Mitosen, Ki67) und einer verbesserten Strukturierung durch Adhäsionsproteine (Kollagen IV und Laminin 5), das für die Verankerung in der Dermis verantwortlich ist.**

### **3.1.3. Genaktivierungen durch PROCAPIL™ (BIOALTERNATIVES-Studie)**

#### **Prinzip**

Die DNA-Array-Studie verwendete ein Panel von 600 Genen, die aufgrund ihres Interesses in Bezug auf die Zellfunktion ausgewählt wurden. Die Studie zeigte eine Hoch- und eine Herunterregulierung der Markergene und ermöglichte so die Definition eines Profils der Mechanismen, die für die Wirkung des kosmetischen Wirkstoffs auf Keratinocyten- und Fibroblastenpopulationen verantwortlich sind.

#### **Protokoll**

Die DNA-Array-Studie wurde an mit SkinEthic® rekonstituierten menschlichen Epidermisproben durchgeführt, die in Gegenwart von PROCAPIL™ (Komplex PROCAPIL™

bestehend aus 3 Wirkstoffen: Peptid-Biotinyl-GHK, Oleanolsäure und Apigenin) inkubiert wurden.

Die Inkubation wurde 18 Stunden lang durchgeführt. Die in den Zellen vorhandene mRNA wurde revers transkribiert, um DNA zu ergeben, und amplifiziert (RT-PCR-Verfahren), um ein lesbares Signal vs. die Kontrollkulturen.

Das resultierende Bild ist eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt 18 Stunden der durch PROCAPIL™ hochregulierten oder herunterregulierten Gene.

### Ergebnisse

Die Tabellen auf den folgenden Seiten zeigen die Ergebnisse, die als signifikant vs. die Kontrolle: mindestens 30 % positive oder negative Veränderung.

Wenn kleinere Veränderungen (20 bis 30 %) in mehreren verwandten Genen beobachtet wurden, wurde diesen Veränderungen nichtsdestotrotz eine mechanistische Bedeutung zugeschrieben.

### **Gene hochreguliert vs. die Kontrolle (100%) und Kodierung für Proteine:**

<b>Veränderung der Genexpression unter Exposition gegenüber PROCAPIL™</b>	<b>%</b>
<b><u>Adhäsionskomplexproteine</u></b>	
Desmosomale Proteine 1 & 3 (Desmogleine)	135 % / 138 %
Desmocollin 1	146%
Fibronectin-Rezeptor $\beta$ -Untereinheit	134%
Vimentin	138%
Laminin-bindendes Protein	146%
Integrin $\beta$ 1 & $\beta$ 2	134 % / 144 %
<b><u>Antioxidative Enzyme</u></b>	
Thioredoxinperoxidasen (TDPX2 & AO372)	152 und 174 %
SOD (mitochondrial & zytosolisch)	150 und 169 %
Metallothioneine MTH & HMT	188 und 190 %
CYP b-Reduktase	160%
<b><u>Stressproteine</u></b>	
HSP 27	164%
HSP 90	139%
<b><u>Entzündungshemmende Proteine</u></b>	
Interferon $\gamma$ Gegner	135%
<b><u>Enzyme des Zellstoffwechsels</u></b>	
Mitochondriales trifunktionelles Protein & Acyl-CoA-Vorläufer	123 und 128%

Ornithindecaboxylase	132%
Glutaminsynthetase	136%
Acetyl-CoA-Transferase	137%
Isocitratdehydrogenase	189%
iNOS	143%
NADP-Isocitrat-Dehydrogenase	189%
<b><u>Proliferations-/Differenzierungsmarker</u></b>	
Proliferierendes Zellkernantigen (PCNA)	191%
Cytokeratine 10, 14 und 16	154/150/144 %
Steroidrezeptor-Co-Aktivator	160%

**Herunterregulierte Gene vs. die Kontrolle (100%) und  
Kodierung für Proteine:**

Veränderung der Genexpression unter Exposition gegenüber PROCAPIL™	%
<b>Entzündungsfördernde Proteine</b>	
Interferon $\gamma$ Rezeptor	-57%
<b>Angiogenese- und Matrixumbaufaktoren</b>	
Vitronektin	-52%
TIMP1 / TIMP2	-43 % / -24 %
Antichymotrypsina1	-43%
Lysylhydroxylasen 1 & 2	-50 % / -29 %
Heparansulfat-Proteoglykan	-40%
Kollagen 1 Untereinheit	-46%
<b>Regulierung der Zellproliferation</b>	
Retinsäure-bindende Proteine CRABP1/CRABP2	-34 % / -63 %
Vit. D3-Rezeptor	-40%

**Deutung**

Die hochregulierten Gene spiegeln ein auf hohe Wachstumsaktivität ausgerichtetes Zellprofil mit sehr stark exprimierten Zellstoffwechsellenzymen (123 bis 189 %, je nach Enzym) wider. Antioxidative Schutzenzyme wurden ebenfalls in Verbindung gebracht, da es notwendig ist, die Zelle vor den freien Sauerstoffradikalen zu schützen, die systematisch durch die hohe Stoffwechselaktivität erzeugt werden.

Marker der Zellproliferation wie proliferierendes Zellkernantigen (PCNA), Steroidrezeptor-Co-Aktivator und Zytokeratine 10, 14 und 16 (Proliferation und Differenzierung) waren deutlich hochreguliert, aber auch mit dem Protein HSP27 assoziiert (164 %), was auf eine pro- Differenzierungsaktivität (JONAK,

2002). Die Differenzierung wurde von einer Zunahme mehrerer Adhäsionsproteine begleitet: solche, die den Zusammenhalt zwischen Zellen und die Adhäsion und den Einsatz von Keratinozyten in Zellschichten ermöglichen (Desmogleine, Desmocolline); diejenigen, die an der Zellanheftung an die Basallamina beteiligt sind (Laminin-bindendes Protein, Vimentin, Integrina und  $\beta$ ) und schließlich solche, die eine Verankerung mit der umgebenden Dermis gewährleisten (Desmogleine, Desmocolline).

Die Herunterregulierung der Gene spiegelte sich in der verringerten Expression des Interferonrezeptors (-57 %) wider, verbunden mit einer Erhöhung des Interferonantagonisten (+135 %), die beide einen starken entzündungshemmenden Beitrag leisteten.

So wurden die am Matrixumbau und der Angiogenese beteiligten Gene vorübergehend herunterreguliert, während die Zellproliferationswege durch eine Abnahme der Faktoren intensiviert wurden, die sich negativ auf diese Wege auswirkten: CRABP 1/2 (zytoplasmatische Retinsäure-bindende Proteine) und Vitamin D3-Rezeptor (Transkriptionsfaktor für Zellproliferation und -differenzierung).

### **Die Stärken der Markierer:**

Desmoglein sind Adhäsionsproteine, die für die Adhäsion zwischen Keratinozyten unentbehrlich sind (GARROD et al., 2002; NUBER et al., 1996) und die zur Bildung der äußeren Wurzelscheide des Haares beitragen. Sie sind auch an der Verankerung der Wurzelscheide an dermalen Strukturen beteiligt: Mäuse, bei denen die Desmoglein-Gene ausgeschaltet wurden, verlieren vorzeitig ihre Telogenhaare (Hanakawa Y, 2002).

Vimentin ist ein Bestandteil der von Keratinozyten synthetisierten Matrix am Übergang zwischen Epithelgewebe und Mesenchym (Dermis), der eine Rolle bei der Morphogenese von Haaren spielt (TAMIOLAKIS et al., 2001).

Zytokeratine 10 (Differenzierung), 14 und 16 (Morphogenese der Haare und Keratinozytenproliferation) und die metabolischen Enzyme und Marker der Zellmitose (proliferierendes Zellkernantigen) charakterisieren eine keratinozytäre Hyperaktivität, die auf die Morphogenese neuer Gewebe ausgerichtet ist.

Es ist interessant festzustellen, dass der Vitamin-D3-Rezeptor und die Rezeptoren für Retinsäure (CRABP 1/2) vorübergehend herunterreguliert werden: Die Hemmung der Transkription wird aufgehoben, was die De-novo-Synthese von DNA und die Zellproliferation fördert (KROHN et al., 2003). und Follikelüberleben (BILLONI, 1997).

Da die Rezeptoraktivität auch von Steroiden wie den Androgenen, darunter Dihydrotestosteron (DHT), abhängt, spiegelt die geringe Rezeptorexpression auch das Fehlen einer hormonellen Aktivierung wider.

Es gibt subtile Wechselwirkungen zwischen Retinoid-, Steroid- und Vitamin-D3-Rezeptoren (und in Gegenwart oder Abwesenheit ihrer Co-Effektoren). Diese Rezeptoren sind daher wichtige Faktoren bei der Morphogenese des Haarfollikels.

Die Wirkung von PROCAPIL™ umfasst somit jene wesentlichen Faktoren für die Haarmorphogenese und das Haarwachstum.

Unter den verschiedenen hochregulierten Genen sind die unterschiedlichen Wirkungen von Peptiden Biotinyl-GHK (Adhäsions- und Proliferationsgen), Biotin (starke mitochondriale Aktivität) und Oleanolsäure (Deaktivierung der CRABP 1- und 2- und Vitamin-D3-Signalwege) sind Patente.

### **Schlussfolgerung zu den In-vitro-Daten**

**Bemerkenswert ist die bemerkenswerte Konsistenz der Daten, die durch die DNA-Array-Studie an synthetischer Epidermis und die morphologische Studie an kultivierten menschlichen Haarfollikel-Explantaten generiert wurden:**

- **Hohe Anti-Aging-Aktivität mit Ki67, verbesserter allgemeiner Morphologie (Wurzelscheide und Papille), antioxidativen zellulären Enzymen und aktivierten PCNA-Proliferationsmarkern.**
- **Hohe De-novo-Synthese von Proteinen des Adhäsionskomplexes (Kollagen IV, Laminin 5, Vimentin, Desmogleine und Desmocolline).**
- **Deutliche Stimulation des Zellstoffwechsels (mitochondriale Enzyme) und Wachstumsaktivierung (Haarschaft und Zytokeratine 10, 14 und 16).**

**Die obigen Daten stimmen mit dem Profil eines Produkts überein, das die Haarmorphogenese fördert und die Verankerung der Wurzelscheide in der Dermis verstärkt.**

**Das Produkt ist substantiv und spezifisch auf dem Haar lokalisiert (Immunlokalisation entlang der Länge des Follikels, Abwesenheit im umgebenden Gewebe).**

### **3.2. In vivo Studien**

**Viermonatige placebokontrollierte klinische Studie (DERMSCAN-Labors).**

## Prinzip

Da vor allem Männer von Geheimratsecken und beginnender Glatze betroffen sind, wurde eine Studie an männlichen Probanden mit diesem Problem ins Leben gerufen. Um das Telogen vollständig abzudecken, wurde eine Studiendauer von 4 Monaten gewählt.

Mit der Videotrichogramm-Methode wurde das Verhältnis des Anteils der Haare in der Anagenphase und des Anteils in der Telogenphase (A/T-Parameter) ermittelt und im zeitlichen Verlauf verfolgt.

## Protokoll

- Einschlusskriterien

35 männliche Probanden kaukasischer Herkunft im Alter zwischen 18 und 50 Jahren und mit mehr als 20 % ihrer Haare in der Telogenphase wurden eingeschlossen.

- Ausschlusskriterien

Graues Haar auf dem Scheitel.

Erkrankungen der Kopfhaut.

Einnahme von Kortikosteroiden, Immunsuppressiva oder Retinoiden in den 6 Monaten oder entzündungshemmende Mittel in der Woche vor der Studie.

Lokale Anwendung von Minoxidil® oder einer anderen lokalen „Anti-Haarausfall“-Behandlung, topisch angewendet oder oral eingenommen, oder trophische Behandlung des Haares in den letzten 3 Monaten. Topische oder orale Behandlung der Kopfhaut (antiseborrhoische, tägliche Anti-Schuppen-Reibung in den 4 Wochen vor der Studie).

Änderung der Ernährungs- oder Bewegungsgewohnheiten während der Studie. Unmäßiger Konsum von Alkohol oder Tabak.

- Produktanwendung

Das Produkt oder Placebo wurde zweimal täglich durch sanfte Massage auf die Kopfhaut aufgetragen.

**PROCAPIL™** wurde als 3% verdünnte Alkohollotion mit dem Aussehen einer farblosen Flüssigkeit formuliert. Das Placebo war nicht unterscheidbar (Formel in Anhang 1 angegeben).

- Konformität / Sicherheit

Compliance- und Sicherheitsbesuche wurden nach 4, 8 und 12 Behandlungswochen durchgeführt.

Zu den Zeitpunkten T0 und T4 Monate wurde eine körperliche Untersuchung der Kopfhaut durch einen Dermatologen durchgeführt und die Sicherheit wurde durch ein Interview mit den Probanden bewertet.

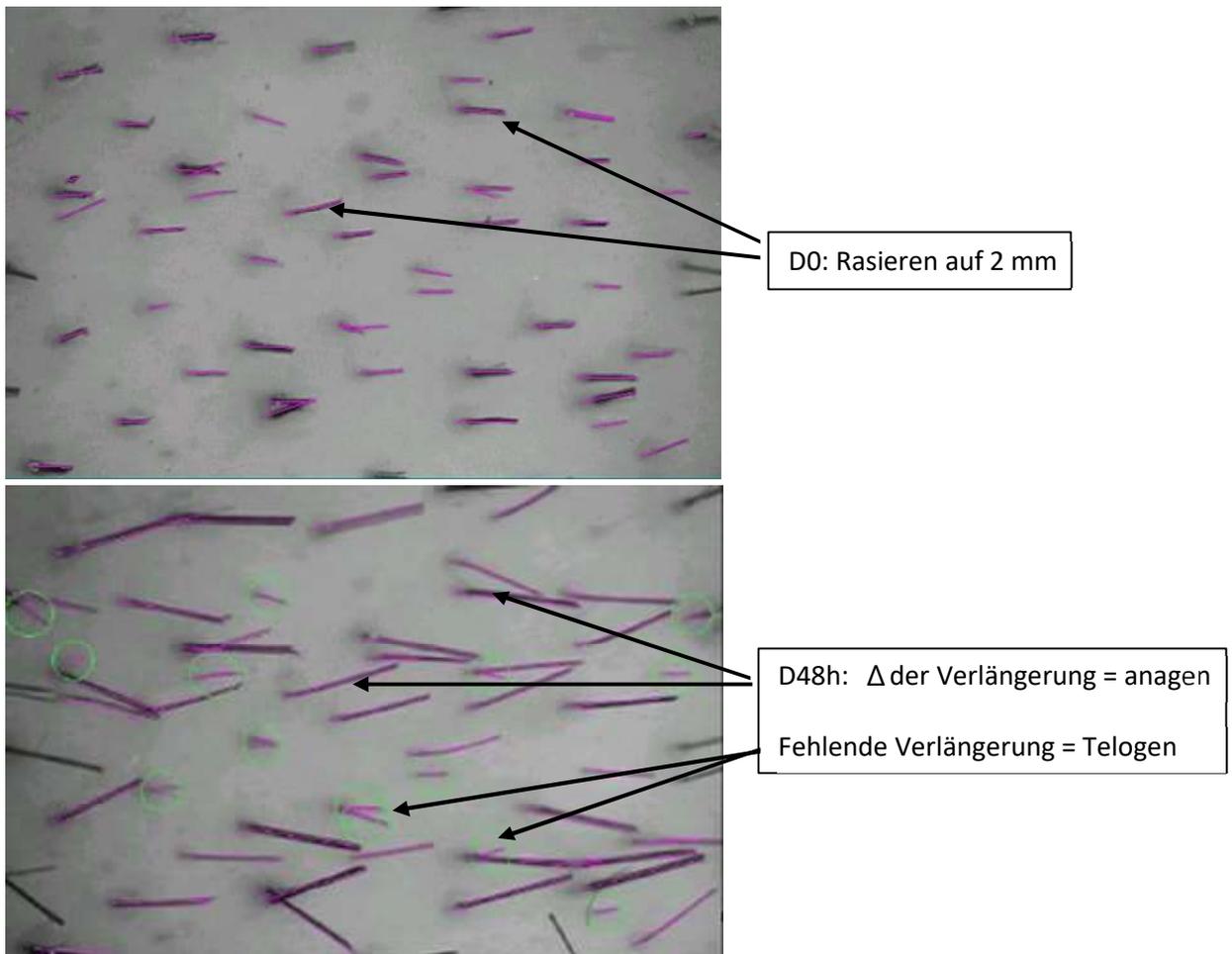
- Video-Trichogramm

Das verwendete System bestand aus einem SCOPEMAN® MS-500-Videomikroskop von MORITEX, das mit einem mobilen 25X-Objektiv mit Lichtleitfaser ausgestattet und mit einem digitalen Bilderfassungssystem verbunden war.

Die Bilder wurden mit dem von Laboratoires DERMSCAN entwickelten COUNT-HAIR®-Programm analysiert.

Die Bildaufnahme bei T0 und nach 4 Monaten wurde nach der Markierung an derselben rasierten Haarzone (durchschnittlich etwa 1 cm<sup>2</sup> / 200 Haare) durchgeführt.

Die überwachten Parameter waren die Länge und Wachstumsrate der Haare sowie der Anteil der Haare in der Anagenphase und der Anteil in der Telogenphase.



- Haarproben: morphologische Analyse und Immunmarkierung von Kollagen IV und Laminin 5.

Bei T0 und am Ende der Studie wurden 24 Haare von der Grenze der alopezischen Zone mit einer Pinzette entnommen. Sechs Probanden in der Behandlungsgruppe und 6 in der Placebogruppe wurden einer Probenahme unterzogen.

Die Haare wurden in Bouin-Flüssigkeit (12 Haare) fixiert oder unmittelbar eingefroren (12 Haare), bevor sie zur Analyse an BIO-EC verschickt wurden.

## Ergebnisse

### **a) Klinische Prüfung**

Von den 35 in die Studie eingeschlossenen Probanden wurden 18 der PROCAPIL-Gruppe zugeteilt ( $37 \pm 2$  Jahre) und 17 in die Placebogruppe ( $38 \pm 1$  Jahr). Die Zuordnung der Probanden zu den PROCAPIL™- und Placebo-Gruppen erfolgte randomisiert.

- Sicherheit

**PROCAPIL™** wurde von allen Freiwilligen während der 4-monatigen Anwendung sehr gut vertragen.

- Video-Trichogramm

Klinische Studien, die darauf abzielen, die Wirkung einer Behandlung auf die Gesundheit der Kopfhaut zu messen, verwenden verschiedene Bewertungskriterien. Die Haardichte (Anzahl der Haare / cm<sup>2</sup>) wird für Produkte verwendet, die das Wachstum / Nachwachsen beanspruchen. Prozentsätze von Haaren in anagenen und telogenen Phasen (Wachstum oder Verlust) sowie Verhältnisse dieser Prozentsätze sind besser geeignet für die Analyse der Haarverankerung und Haarvitalität, die (noch) auf der Kopfhaut vorhanden ist. Diese letztgenannten Parameter wurden daher für die Studie ausgewählt.

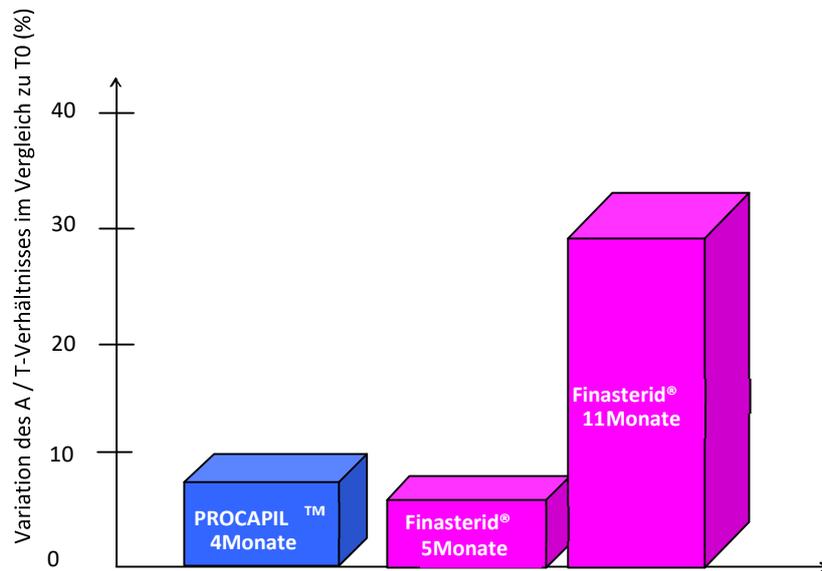
### **Anagen/Telogen-Verhältnis**

Die folgende Abbildung zeigt das Anagen/Telogen-Verhältnis zu Studienbeginn und nach 4-monatiger Behandlung im Vergleich zu Daten, die für Finasterid® nach oraler Anwendung (Van Neste et al. 2000) für 11 Monate veröffentlicht wurden.

Nach 4 Monaten PROCAPIL™-Behandlung zeigten die Probanden eine deutliche Verbesserung des Anteils der Haare in der Anagenphase, signifikant besser als T0 (+ 10 %, p < 0,05). Das Placebo ist inaktiv. Der Vergleich mit den für Finasteride® veröffentlichten Daten durch orale Verabreichung zeigt, dass PROCAPIL™ ebenfalls eine bemerkenswerte Aktivität aufweist.

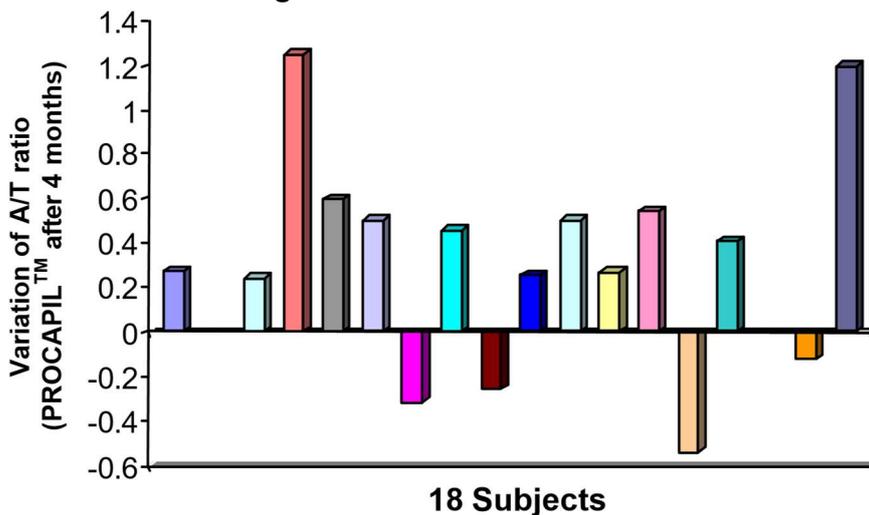
Tatsächlich wird von einer mäßigen 8%-Variation des A/T-Verhältnisses (im Vergleich zu T0) berichtet

Finasteride® nach 5 Monaten, Schwankung stark ansteigend bis 33 % nach 11 Monaten.



In der PROCAPIL-Gruppe zeigten 67 % der Probanden eine Verbesserung des A/T-Verhältnisses und bei 3 von 12 Probanden verbesserte sich der A/T-Anstieg um 31,2, 33,5 bzw. 46,3 %.

Im Gegensatz dazu gab es in der Placebogruppe einen Trend zu einer Abnahme der Anagenhaare.



### Wachstumsrate

Die durchschnittliche Haarwachstumsrate der 17 Probanden zeigte keinen signifikanten Unterschied, Baseline vs. Ende des Studiums. Jedoch wurde bei 8 Freiwilligen, die eine Steigerung der Wachstumsrate aufwiesen, in der mit PROCAPIL™ behandelten Gruppe ein Trend zur Verbesserung gezeigt.

In der Placebo-Gruppe sank die mittlere Wachstumsrate tendenziell (-3 %) und die Mehrheit der Probanden zeigte keine Verbesserung: 11 von 16 Probanden.

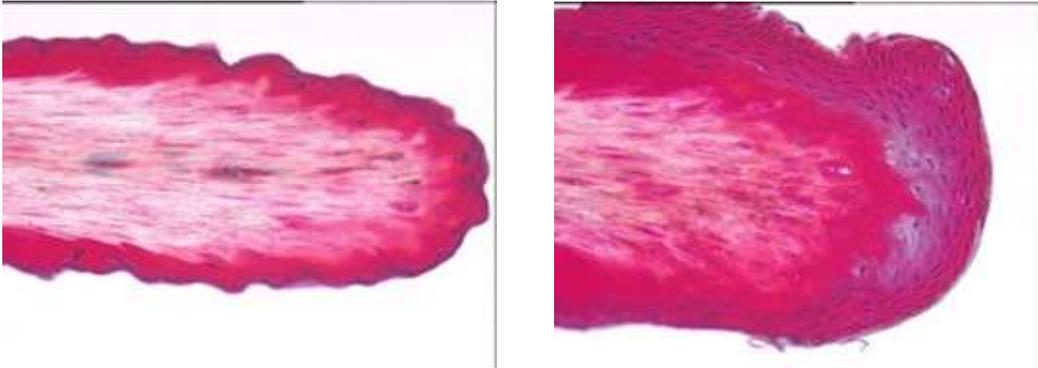
**Diese Ergebnisse lassen uns den Schluss ziehen, dass PROCAPIL™ dank seiner haarverankernden Wirkung in der Haut insgesamt ein starker Moderator von Haarausfall ist, wie die Bilder im nächsten Kapitel beweisen.**

### ***b) Morphologische Veränderungen der Haare nach 4 Monaten***

Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden nach 4 Monaten seriell unter Verwendung von Telogenhaar (durch Herausziehen einer Probe entnommen) beobachtet.

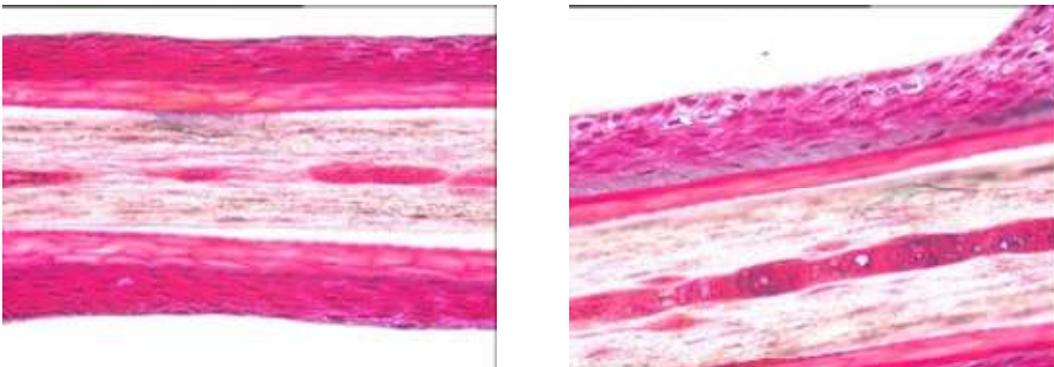
- Unterschiede zum Zeitpunkt 4 Monate, PROCAPIL™ vs. Placebo

Die mit PROCAPIL™ behandelte Gruppe zeigte viel stärker strukturierte Haarzwiebeln:



Placebo T4 Monate (Zwiebel) PROCAPIL™ T4 Monate (Zwiebel)

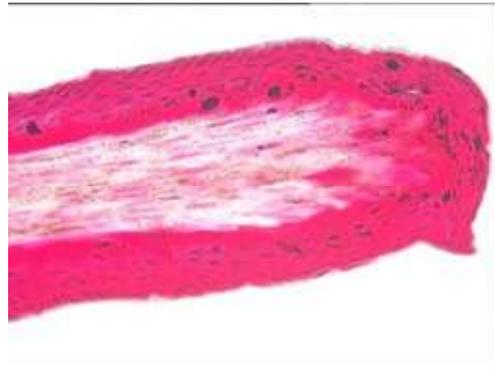
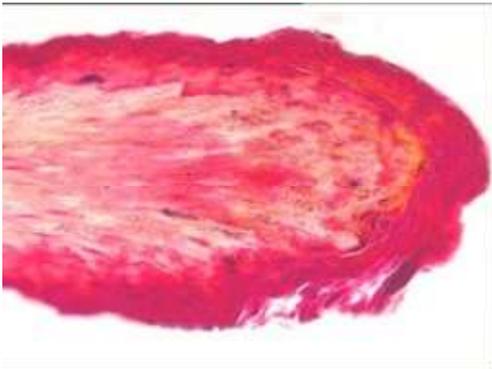
Darüber hinaus zeigte das mit PROCAPIL™ behandelte Haar Wurzelhüllen mit gut differenzierten Zellbasen, sehr deutlich verankert in Bezug auf den inneren Haarschaft, aber auch mit einer sehr guten äußeren Grenzfläche (Verankerung in der Dermis).



Placebo T4 Monate (Wurzelscheide) PROCAPIL™ T4 Monate (Wurzelscheide)

- Unterschied, T0 vs. T4 Monate, für Anagen- und Telogenhaare

Bei einem bestimmten Subjekt wurden deutliche Unterschiede beobachtet, T0 vs. T4 Monate. Wie unten gezeigt, wurde die Knollenzone von Telogenhaaren sehr deutlich verbessert:



**PROCAPIL™ T0 (Zwiebel) PROCAPIL™ T4 Monate (Zwiebel)**

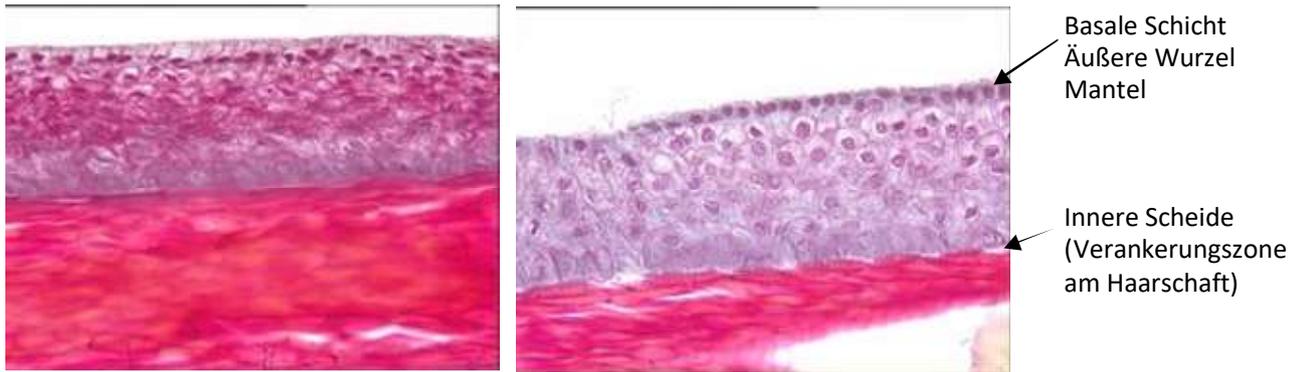
Die Wurzelscheide der Anagenhaare verbesserte sich ebenfalls, mit Verdickung und klar definierten Zellbasen:



**PROCAPIL™ T0 (Wurzelscheide) PROCAPIL™ T4 Monate (Wurzelscheide)** In der PROCAPIL™ -Gruppe wurde eine qualitativ hochwertige Wurzelscheide mit einer perfekt strukturierten Basallamina beobachtet, die eine optimale dermal-epidermale Haftung auf der Außenseite des Haares gewährleistet.

Auf der Seite der inneren Wurzelscheide wurden Verankerungszonen mit dem Haarschaft beobachtet.

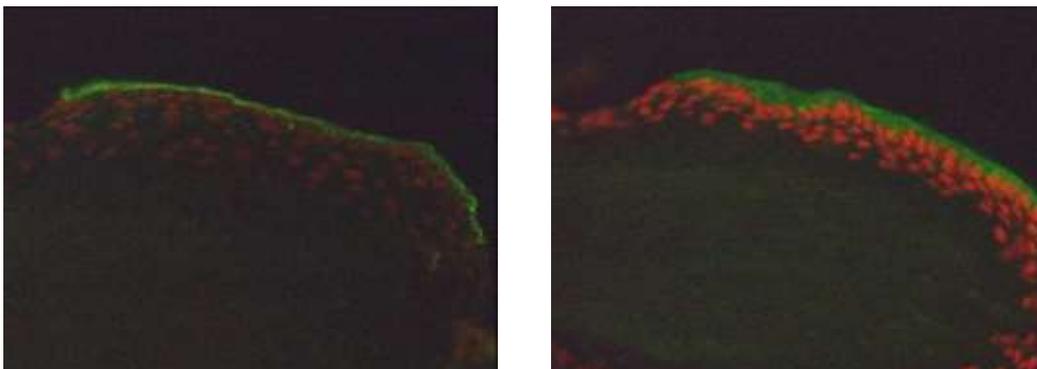
Im Gegensatz dazu waren diese beiden Zonen in der Placebogruppe nicht sehr strukturiert.



Placebo T4 Monate PROCAPIL™ T4 Monate

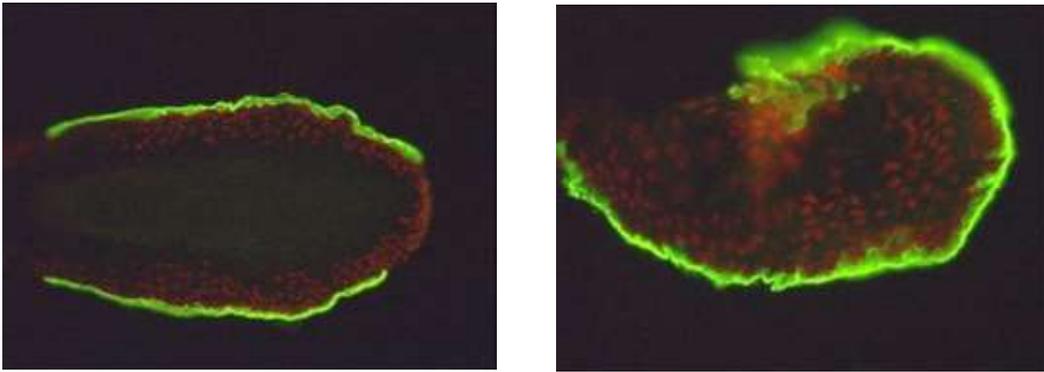
**Die Immunfluoreszenzbefunde in Bezug auf die Marker Kollagen IV und Laminin 5 untermauerten die bisherigen Befunde weiter:**

Eine stärkere Laminin-5-Fluoreszenz der Wurzelscheide wurde für die Telogenzwiebeln in der PROCAPIL-Gruppe beobachtet.



Placebo T4 Monate PROCAPIL™ T4 Monate

Auch die Kollagen-IV-Markierung des Telogenkolbens war in der PROCAPIL-Gruppe stärker ausgeprägt:



Placebo T4 Monate PROCAPIL™ T4 Monate

### Schlussfolgerung zu den In-vivo-Daten

**Die Ergebnisse der 4-monatigen klinischen Studie, die eine vollständige Telogenphase abdeckte, zeigten einen signifikanten Anstieg im Anagen/Telogen-Verhältnis vergleichbar mit der oralen Behandlung mit Finastéride® in der mit PROCAPIL™ behandelten Gruppe.**

**Dieser Befund stimmte perfekt mit den morphologischen Befunden überein, die an Haarproben einiger Probanden in den PROCAPIL™- und PLACEBO-Gruppen gemacht wurden:**

**Wiederherstellung einer perfekt strukturierten Wurzelscheide auf dem Telogenhaar mit einer strukturierten und regelmäßigen Basallamina für eine gute Verankerung in der Dermis. Dies wurde durch das größere Vorhandensein von Adhäsionskomplexproteinen bestätigt: Kollagen IV und Laminin 5. Die innere Wurzelscheide zeigte Adhäsionsmotive zwischen dem Haarschaft und der Scheide.**

### 4.ZUSAMMENFASSENDE SCHLUSSFOLGERUNG

**PROCAPIL™ ist ein starker Anti-Haarausfall-Komplex, der auf die drei Phänomene abzielt, die für Haarausfall verantwortlich sind:**

- **5 $\alpha$ -Reduktase, die Testosteron in DHT umwandelt**
- **Unzureichende Durchblutung**
- **Fehlende Verankerung der Haare in der dermalen Papille.**

**PROCAPIL™ besteht aus 3 Wirkstoffen, die zusammen wirken:**

- **Peptid Biotinyl-GHK, ein Matrikin, das dank Adhäsionsproteinen auf die Verankerung des Haares wirkt**
- **Apigenin, ein Zitrusextrakt-Flavonoid mit gefäßerweiternder Wirkung**
- **Oleanolsäure, extrahiert aus Olivenbaumblättern, die die Produktion von Dihydrotestosteron über 5 hemmtein-Reduktase.**

**Die in vitro an menschlichen Follikeln und durch Analyse der aktivierten Gene erhaltenen Daten haben gezeigt:**

- **Die Substanz des Produkts gegenüber dem Haarschaft und seine selektive Lokalisierung**
- **Verbesserung der Haarmorphologie mit einer lebendigen Wurzelscheide, die durch Adhäsionsproteine gut strukturiert ist, darunter Vimentin, Desmogleine, Desmocolline, Laminin 5 und Kollagen IV**
- **Starke Wirkung auf die Vermehrung der Keratinozyten und die Haarmorphogenese**

**Diese äußerst positiven Eigenschaften haben sich in vivo als wirksam erwiesen:**

**Die 4-monatige klinische Studie, die die Telogenphase abdeckte, verglich PROCAPIL™ und Placebo und bestätigte die ausgeprägte Wirkung des Komplexes gegen Haarausfall:**

- **Von 18 Freiwilligen in der PROCAPIL-Gruppe zeigten 67 % eine signifikante Verbesserung im Mittel Anagen/Telogen-Verhältnis ( $p < 0,05$ ), im gleichen Bereich, der für Finasteride® nach einer Behandlung von 5 Monaten durch orale Verabreichung berichtet wird. Bestimmte Probanden zeigten nach 4-monatiger Anwendung von PROCAPIL™ eine Verbesserung von mehr als 30 oder sogar 46 %.**

- **Die morphologischen und immunhistologischen Analysen der Haarproben, die zu Beginn und am Ende der Studie entnommen wurden, zeigten, dass die Dichten von Telogenhaar, Wurzelscheide und Laminin 5 und Kollagen IV in der PROCAPIL™ -Gruppe im Gegensatz zu dem, was beobachtet wurde, deutlich verbessert waren in der Placebogruppe.**

**Die obige Reihe von Ergebnissen ermöglicht die Bestätigung, dass PROCAPIL™ wirkt, indem es eine verstärkte Verankerung von Telogenhaar in der Dermis durch Regeneration der Wurzelscheide fördert. PROCAPIL™ verlangsamt somit den Haarausfall und verbessert die Gesundheit der Haarfollikel.**

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

### **VERWEISE**

ALMOND-ROESLER B et al., 1997

Kultivierte dermale Papillenzellen des Vibrissa-Follikels der Ratte. Proliferative Aktivität, Adhäsion und Reorganisation der extrazellulären Matrix in vitro. Arch Dermatol Res., 289 (12), S. 698-704

ANDERSSON S., 2001

Steroidogene Enzyme in der Haut. Eur. J. Dermatol., 11. August (4), S. 293–95

BAYNE EK. et al., 1999

Immunhistochemische Lokalisierung von Typ 1 und 2 5-Alpha-Reduktasen in der menschlichen Kopfhaut. Br. J. Dermatol., Sep. 141 (3), S. 481–91

BILLONnet al., 1997

Expression von Mitgliedern der Retinoid-Kernrezeptor-Superfamilie in menschlichen Haarfollikeln und ihre Auswirkung auf das Haarwachstum. Geset. Derm. Venerol., 77 (5), S. 350-5

BOYERA N. et al., 1997

Biphasische Wirkungen von Minoxidil auf die Proliferation und Differenzierung normaler menschlicher Keratinozyten). Skin Pharmacol., 10, S. 206–20

COLIN AB et al., 1992

Zelluläre und extrazelluläre Beteiligung an der Regeneration des unteren Vibrissenfollikels der Ratte. Entwicklung, 114, S. 887–97 (1992).

DALLOB AL. et al., 1994

Die Wirkung von Finasterid, einem 5-Alpha-Reduktase-Hemmer, auf die Testosteron- und DHT-Konzentrationen der Kopfhaut bei Patienten mit männlichem Haarausfall. J Clin. Endocrinol. Metab. , Sept. 79 (3), S. 703-6

FRIGG M et al., 1989

Klinische Studie zur Wirkung von Biotin auf Hauterkrankungen bei Hunden  
Schweiz. Bogen. Tierheilk, 131, S. 621-25

FRITSCH A. et al., 1991

Pharmakologische Wirkungen von Biotin auf Epidermiszellen  
Schweiz. Bogen. Tierheilk, 133, S. 277-83

GARROD et al., 2002

Desmosom Adhäsion: strukturell Base, molekular Mechanismus  
und Regulierung.

Mol Membr. Biol, 19. April (2), S. 81-94

GERST C et al., 2002

Typ-1-Steroid 5 $\alpha$ -Reduktase ist im Haarfollikel funktionell aktiv, wie durch neue selektive Inhibitoren von entweder Typ-1- oder Typ-2-Humansteroiden belegt wird 5 $\alpha$ -Reduktase Exp. Dermatol, 11, S. 52-8

HANAKAWA Y, 2002

Die Expression von Desmoglein 1 kompensiert den genetischen Verlust von Desmoglein 3 bei der Keratinozytenadhäsion.

J Invest dermatol;, Juli, 119 (1), S. 27-31

JAHODA C. et al., 1992

Veränderungen in der Fibronectin-, Laminin- und Typ-IV-Kollagenverteilung beziehen sich auf die Umstrukturierung der Basalmembran während des Haarwachstumszyklus des Vibrissa-Follikels der Ratte.

J Anat, 181, S. 47-60

JONAK C. et al., 2002

Subkorneale Kolokalisation des kleinen Hitzeschockproteins HSP27 mit Keratinen und Proteinen der Hornhauthülle.

Br. J. Dermatol., Jul. 147 (1), S. 13-9

KROHN et al., 2003

1,25 (OH) (2) D (3) und Dihydrotestoste interagieren, um die Proliferation und Differenzierung von epiphysären Chondrozyten zu regulieren.

Kalk. Gewebe Int. 2003 Juli. 24

MAQUART FX, et al., 1999

Regulation der Zellaktivität durch die extrazelluläre Matrix: das Konzept der Matrikine

Journal of the Society of Biology, 193, (4), S. 423

NUBER UA et al., 1996

Muster der Desmocollin-Synthese in menschlichen Epithelien: Immunlokalisierung von Desmocollinen 1 und 3 in speziellen Epithelien und in kultivierten Zellen

Eur J Cell Biol, Sept. 71 (1), S. 1.13

PAUSE R., 1999

Ein umfassender Leitfaden zur Erkennung und Klassifizierung verschiedener Stadien der Haarfollikelmorphogenese. Die Gesellschaft für Invest. Dermatol.

PHILPOTT MP, et al.,

Kultur der gesamten Haarfollikel

Dermatological Clinics, Okt. 14 (4), S. 595–607

VAN NESTE D et al., 2000

Finasterid erhöht das anagene Haar bei Männern mit androgenetischer Alopezie.

British J of Dermatol., 143, S. 804-10

ROUSSELLE P, 2003

Reparatur von Laminine 5 und Epidermis.

COBIP, Lehrseminar, LYON 2003

SAWAYA ME et al., 2001

Androgen-responsive Gene, da sie das Haarwachstum beeinflussen.

Eur. J. Dermatol., 11. August (4), S. 304-8

SHELLEY WB et al., 1985

Uncombale-Hair-Syndrom: Beobachtungen zur Reaktion auf Biotin und Auftreten bei Geschwistern mit ektodermaler Dysplasie.

J. Am. Acad. Dermatol, 13 (97), S. 97–102

SUORMALA T. et al., 2002

Biotin-abhängige Carboxylase-Aktivitäten in verschiedenen ZNS- und Haut-abgeleiteten Zellen und ihre Empfindlichkeit gegenüber Biotin-Mangel.

Int. J. Vitam. Nutr. Res., 72 (4), S. 278-86

TAMIOLAKIS D et al., 2001

Die Expression von Laminin, Kollagen vom Typ IV und Fibronectinmolekülen hängt mit der Morphogenese der embryonalen Haut und der epidermalen Anhängsel zusammen.

Clin Exp Obstet Gynecol, 28 (3), S. 179-82

ZHANG YH et al., 2000

Endothel-abhängige vasorelaxierende und antiproliferative Wirkungen von Apigenin.

Gen. Phamacol., 35 (6), S. 341–347

WARREN R. et al., 1992

Verbessertes Verfahren zur Isolierung und Kultivierung der Hautpapille der menschlichen Kopfhaut.

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

## **ANHANG**

**Formulierungen, die für die klinische Studie  
verwendet wurden**

Startmaterial	INCI-Bezeichnung	Anbieter	Placebo%	Produkt%
<u>Phase 1</u>				
Demineralisiertes Wasser	Wasser (Aqua)		qs 100	qs 100
Zitronensäure	Zitronensäure		0,26 1,20	0,26 1,20
Natriumcitrat	Natriumcitrat		1.00	1.00
Inkroquat CTC 30	Cetrimonium Chlorid	Kroda		
<u>Phase 2</u>				
Äthanol	Äthanol		8.00	8.00
Duft	Duft		qs	qs
Cricket 1	Polysorbat 20	Kroda	0,40	0,40
<u>Phase 3</u>				
<b>PROCAPIL™</b>	(vgl. Inhaltsangabe)		-	3%
<b>PROCAPIL™</b> Hilfsstoff			3%	-

