

EUROPÄISCHE EIGNUNGSPRÜFUNG 2015

Aufgabe A(Ch)

Chemie

Diese Prüfungsaufgabe enthält:

- | | |
|---------------------------|---------------------|
| * Schreiben des Anmelders | 2015/A(Ch)/DE/1-7 |
| * Dokument D1 | 2015/A(Ch)/DE/8-9 |
| * Dokument D2 | 2015/A(Ch)/DE/10-12 |



Schreiben des Anmelders

La Lisse
Faltenberger Weg 18
Rimpelstein, Österreich

[001] Wir haben uns als Spezialist für Hautpflegeprodukte intensiv mit der Faltenbildung der Haut auseinandergesetzt. Wir haben neue Produkte und Verfahren gefunden, die wir als innovativ erachten und für die wir gerne ein Patent beantragen möchten.

[002] Gesichtsfalten sind ein sichtbares Zeichen der Hautalterung. Es gibt verschiedene Maßnahmen, um Gesichtsfalten zu vermindern. Dazu gehören Gesichtscremes, gesichtsstraffende Operationen und die Injektion von Botulinumprotein wie dem bekannten BOTOX[®].

[003] Die direkte Injektion von Botulinumprotein in den Gesichtsmuskel ist eine der wirksamsten Maßnahmen, um Falten zu vermindern. Allerdings muss die Spritze von fachkundigem Personal, in der Regel einem spezialisierten Arzt, gesetzt werden und kann vom Patienten als schmerzhaft empfunden werden. Außerdem muss die Behandlung in der Regel alle drei bis sechs Monate wiederholt werden, da die Wirkung des Botulinumproteins mit der Zeit erheblich nachlässt.

[004] Wir haben uns gefragt, wie das Botulinumprotein ohne ärztliches Zutun auf das Gesicht aufgetragen werden kann, um durch die Haut zum Gesichtsmuskel zu gelangen. Wie Sie wissen, ist die Haut recht dick und verhindert die Austrocknung des Körpers sowie das Eindringen schädlicher Substanzen in den Körper. Die meisten Verbindungen sind nicht in der Lage die Haut zu durchdringen, um zum Muskel zu gelangen.

[005] Wir haben nun herausgefunden, dass das Botulinumprotein durch die Haut direkt in den Entstehungsbereich der Falten gelangen kann, wenn es an ein Polymer gekoppelt wird und/oder in Form einer Nanoemulsion vorliegt. Beispielsweise kann das Botulinumprotein an Polyethylenglykol (PEG) gekoppelt werden. PEG ist über die bekannten Produzenten in der erforderlichen Reinheit zu beziehen.



[006] PEG hat üblicherweise eine mittlere Molekularmasse von 200 bis 35000 Dalton. Die Bezeichnung der Polyethylenglykole wird dabei über die mittlere Molekularmasse definiert. Beispielsweise hat PEG-5000 eine mittlere Molekularmasse von 5000 Dalton. Die Wirkungsdauer von Botulinumprotein im Körper kann erheblich erhöht werden, wenn das Botulinumprotein an PEG gekoppelt wird.

[007] Wir haben festgestellt, dass nur Botulinumprotein-PEG-Konjugate mit mittelschwerem PEG eine erhöhte Wirkungsdauer im Körper haben und für die Faltenbehandlung geeignet sind. In dieser Anmeldung verstehen wir unter mittelschwerem PEG ein PEG mit einer mittleren Molekularmasse von 2000 bis 15000 Dalton, bevorzugt von 2000 bis 10000 Dalton und ganz besonders bevorzugt von 5000 Dalton.

[008] Wir haben das Botulinumprotein auch an andere Polymere gekoppelt, und zwar an Polyvinylpyrrolidon oder an Hyaluronsäure. Bei der Auswahl der Konjugate für die Faltenbehandlung ist neben einer signifikanten faltenreduzierenden Wirkung unbedingt darauf zu achten, dass die eingesetzten Konjugate hautverträglich sind und keine Entzündungen, Pusteln oder ein Abschälen der Haut verursachen oder Allergien auslösen. Allerdings ist eine leichte Rötung, die wenige Stunden nach der Anwendung wieder von alleine verschwindet, akzeptabel.

[009] Eine geeignete Nanoemulsion kann entweder mit Botulinumprotein alleine oder mit einem Botulinumprotein-Polymer-Konjugat erhalten werden. In Nanoemulsionen haben die Emulsionströpfchen einen durchschnittlichen Tröpfchendurchmesser von weniger als 1000 nm. Sie unterscheiden sich durch ihren geringen durchschnittlichen Tröpfchendurchmesser deutlich von herkömmlichen Emulsionen, die durchschnittliche Tröpfchendurchmesser von über 2000 nm aufweisen.

[010] Die Nanoemulsionen können nach bekannten Verfahren hergestellt werden. Die Tröpfchen in der Nanoemulsion haben einen durchschnittlichen Durchmesser von höchstens 1000 nm, bevorzugt von weniger als 500 nm oder von weniger als 200 nm und ganz besonders bevorzugt von ungefähr 100 nm.



[011] Für eine gleichbleibende Wirkung ist es vorteilhaft, wenn die Tröpfchen in der Nanoemulsion alle gleich groß sind. Ebenfalls ist es vorteilhaft, wenn größere Tröpfchen, beispielsweise mit einem Durchmesser von mehr als 500 nm, nicht in den Nanoemulsionen vorkommen.

[012] Der Fachmann weiß, dass man in einem Verfahren zur Herstellung von Nanoemulsionen mindestens zwei nicht mischbare Phasen verwendet, nämlich eine wässrige und eine Ölphase. Die wässrige Phase kann in unserem Fall beispielsweise Wasser, eine Salzlösung oder ein Ethanol-Wasser-Gemisch sein. Beispielhafte Ölphasen sind Palmöl, Mandelöl, Sonnenblumenöl, Sojaöl, Olivenöl, Silikonöl, Avokadoöl, oder jedes andere Öl, das für die kosmetische Verwendung geeignet ist. Die Ölphase kann weiterhin oberflächenaktive Stoffe enthalten wie Lecithin, Phospholipide, Polysorbat oder Stearylamin, wobei Lecithin wegen seiner Verträglichkeit bevorzugt wird. Das Botulinumprotein oder sein Konjugat wird in die wässrige Phase gegeben.

[013] Für die Herstellung von Nanoemulsionen müssen hohe Scherkräfte erzeugt werden. Hierbei kommen bekannte Verfahren wie beispielsweise eine Hochdruck-Homogenisierung zum Einsatz. Wir benutzen in unserem Betrieb einen Mikrofluidizer als Hochdruck-Homogenisator. In unserem Verfahren ist es erforderlich, dass die beiden Phasen miteinander vermischt und einem Druck von mindestens 1000 bar über einen Zeitraum von mindestens 30 Sekunden bis nicht mehr als 10 Minuten ausgesetzt werden, um eine Nanoemulsion zu erhalten. Als vorteilhaft hat sich erwiesen, die beiden miteinander vermischten Phasen einem Druck von 1500 bis 2000 bar auszusetzen, um Tröpfchen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von unter 500 nm zu erhalten.

[014] Wir haben bei der Herstellung von Nanoemulsionen erkannt, dass die Zusammensetzung der im Verfahren verwendeten Phasen Auswirkungen auf die Verteilung der Tröpfchengröße hat. Es werden zwei Phasen miteinander vermischt, wobei die wässrige Phase mindestens 90 vol% und die Ölphase 10 vol% oder weniger ausmachen. Das Gewichtsverhältnis von oberflächenaktivem Stoff zu Öl beträgt dabei 2:1 oder mehr, beispielsweise 2,5:1 oder 3:1. Setzt man nun die miteinander vermischten Phasen den oben erwähnten vorteilhaften hohen Drücken aus, so erhält man gleich große Tröpfchen mit einem Durchmesser von 100 nm +/- 10 nm.



[015] Die Botulinumprotein-Konjugate und/oder die Nanoemulsion werden in eine handelsübliche Creme eingerührt. Diese Botulinumprotein-haltige Creme wird am besten mittels einer Pipette auf die gewünschte Gesichtspartie aufgetragen, um die Creme möglichst zielgerichtet auf die Hautoberfläche zu bringen. Geeignete Pipetten sind beispielsweise Einmalpipetten aus Polyethylen mit einem Nennvolumen von 1 bis 10 ml und einem integrierten Saugbalg. Solche Einmalpipetten werden von unserer Tochterfirma Easycare, Inc. unter dem Namen CANULETTA vertrieben. Geeignete Pipetten können mit unserer Creme als Kit verkauft werden.

[016] Bei der Herstellung der Botulinumprotein-haltigen Creme können alle dem Fachmann bekannten Cremes verwendet werden. Dieser Creme können weitere Zusatzstoffe beigegeben werden, wie beispielsweise Verdickungsmittel, Farbstoffe, Duftstoffe, Konservierungsmittel oder weitere Substanzen, die eine fältchenglättende Wirkung haben wie Vitamin C, Retinol, Kollagen oder Coenzym Q.

[017] In der Regel wird die Botulinumprotein-haltige Creme alle ein bis vier Monate aufgetragen. Bei mäßiger Faltenbildung empfiehlt sich ein Auftragsintervall von zwei Monaten. Bei starker Faltenbildung kann die Creme auch monatlich aufgetragen werden.

Unsere Erfindung wird durch die folgenden Beispiele veranschaulicht.

[018] Beispiel 1

Herstellung des Botulinumprotein-Konjugates

1,5 mg Botulinumprotein werden mit 7,5 mg PEG-5000 oder PEG-10000 versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Konjugate von Botulinumprotein mit Polyvinylpyrrolidon oder Hyaluronsäure haben wir auf analoge Art und Weise hergestellt.

[019] Beispiel 2

Herstellung einer Botulinumprotein-haltigen Creme

5 mg eines der Botulinumprotein-Konjugate aus Beispiel 1 oder 1 mg unkonjugiertes Botulinumprotein werden in 350 g einer handelsüblichen Creme eingerührt.



[020] Beispiel 3Herstellung einer Nanoemulsions-Creme

Zur Herstellung einer Nanoemulsion werden 250 g Lecithin und 100 g Mandelöl im Gewichts-Verhältnis 2,5 : 1 gemischt und auf 40°C erwärmt. 5 mg von den jeweiligen Botulinumprotein-Polymer-Konjugaten aus Beispiel 1 oder 1 mg von unkonjugiertem Botulinumprotein werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Diese wässrige Lösung wird zu der Mandelöl-Lecithin-Mischung gegeben. Nach dem Rühren wird die Mischung einem Druck von 1500 bar in einem Mikrofluidizer für 2 Minuten ausgesetzt. Die so erhaltene Nanoemulsion wird mit einer handelsüblichen Creme im Verhältnis 1:1 verrührt. Tabelle 1 zeigt den durchschnittlichen Durchmesser der Tröpfchen, gemessen über die dynamische Lichtstreuung.

Tabelle 1

Zusammensetzung	Gewichtsverhältnis Lecithin: Mandelöl	Durchschnittlicher Tröpfchen- durchmesser [nm]
Botulinumprotein (unkonjugiert)	1:1	550
Botulinumprotein (unkonjugiert)	2,5:1	110
Botulinumprotein-PEG-5000- Konjugat	1:1	500
Botulinumprotein-PEG-5000- Konjugat	2,5:1	90

[021] Beispiel 4

Die Botulinumprotein-haltige Creme aus Beispiel 2 oder die Botulinumprotein-haltige Nanoemulsions-Creme aus Beispiel 3 wurde auf der Stirn von fünf Testpersonen im Alter von 50 bis 60 Jahren mit ausgeprägten Stirnfalten aufgetragen. Von der jeweiligen Creme wurden 0,5 bis 0,8 ml mittels einer Pipette auf die Stirn eines Probanden aufgebracht und in die Haut einmassiert, bis keine Creme mehr sichtbar war. Die Stirn wurde dann nach einem Tag und danach wöchentlich über einen Zeitraum von 4 Monaten beobachtet und mittels Foto- und Videoaufnahmen verglichen. Die Faltenverminderung nach 2 Wochen/4 Wochen/8 Wochen/12 Wochen und eventuelle Nebenwirkungen werden in Tabelle 2 für die Botulinumprotein-haltige Creme und in Tabelle 3 für die Botulinumprotein-haltige Nanoemulsions-Creme aufgeführt.



Tabelle 2: Botulinumprotein-haltige Creme

Zusammen- setzung	Verwendetes Polymer	Faltenverminderung in % nach (2/4/8/12) Wochen	Nebenwirkungen
1	-	10/0/0/0	Keine
2	PEG-5000	35/35/30/25	Leichte Rötung während 1 Stunde
3	PEG-10000	35/30/25/20	Keine
4	Polyvinylpyrrolidon	50/50/40/40	Starke Pusteln im Stirn- bereich während 1 Woche
5	Hyaluronsäure	5/0/0/0	Keine

Tabelle 3: Botulinumprotein-haltige Nanoemulsions-Creme

Zusammen- setzung	Verwendetes Polymer	Faltenverminderung in % nach (2/4/8/12) Wochen	Nebenwirkungen
6	-	45/30/20/10	Keine
7	PEG-5000	60/55/50/35	Keine
8	PEG-10000	50/50/40/30	Keine
9	Polyvinylpyrrolidon	90/80/60/40	Abschälen der Haut auf der Stirn
10	Hyaluronsäure	15/10/0/0	Keine

Die Tests zeigen, dass die Cremes, die das Botulinumprotein-PEG-Konjugat enthalten, eine akzeptable Faltenverminderung bei keinen oder nur sehr leichten Nebenwirkungen erzielen. Unterhalb einem Wert von 20% ist die Faltenverminderung nicht akzeptabel.

[022] Wir möchten Sie auf die beiden Dokumente D1 und D2 in der Anlage hinweisen.



[023] Da die Konkurrenz auf diesem Gebiet sehr aktiv ist, bitten wir Sie, die Anmeldung zügig einzureichen. Wir möchten dabei keine Gebühren für Ansprüche zahlen.

Mit freundlichen Grüßen,
Beppo Dellaruga



Dokument D1

Fachinformationen für die Kosmetikbranche, Dezember 2013

[001] Die brasilianische Firma ESTATICA ist dem schönheitsbewussten Konsumenten schon seit Jahren mit der Gesichtscreme KENTORA bekannt. Diese Botulinumprotein-haltige Creme hat sich beim Glätten kleinerer Gesichtsfältchen bewährt. Für die Behandlung tieferer Falten geht allerdings kein Weg an der Injektion von Botulinumprotein vorbei.

[002] ESTATICA hat daher seine Aktivitäten auf den lukrativen Markt der injektösen Behandlung tieferer Falten ausgeweitet. ESTATICA ist jetzt ein entscheidender Durchbruch in der Faltenbehandlung gelungen: war es bis jetzt notwendig, sich alle 3 bis 6 Monate mit Botulinumprotein die Falten wegspritzen zu lassen, ist diese unangenehme Prozedur nur noch etwa einmal im Jahr nötig. Die Forscher der Firma haben das bekannte Botulinumprotein an ein Polymer gekoppelt und so seine Wirkungsdauer verlängert.

[003] Das nun vorgestellte Botulinumpräparat TEEN-KAR enthält ein Konjugat von Botulinumprotein und einem Polyethylenglykol aus der Gruppe der sogenannten mittelschweren Polyethylenglykole (mittlere Molekularmasse von ungefähr 2500 bis ungefähr 15000 Dalton). TEEN-KAR wird als wässrige Lösung angeboten.

[004] Tests mit 50 Anwendern haben bestätigt, dass das Präparat gut hautverträglich ist und zu keinen nennenswerten Nebenwirkungen nach der Injektion führt.

[005] Bei den meisten Patienten hielt die Wirkung mindestens 10 Monate an, nach 12 Monaten wurde eine weitere Behandlung empfohlen. In Einzelfällen wurden die Falten erst 14 Monate nach der Injektion wieder signifikant sichtbar. Das ist ein Erfolg, der bis jetzt noch von keinem anderen Hersteller von injizierbaren Botulinumprotein gezeigt worden ist. TEEN-KAR kommt in den nächsten Wochen in den Handel.

[006] ESTATICA ist dabei, ihre Produktpalette weiter auszuweiten und die Wirksamkeit seiner Botulinumpräparate zu erhöhen. Dabei könnten statt Polyethylenglykol andere Polymere verwendet werden.



[007] Manuel da Silva, Geschäftsführer von ESTATICA, sieht weiteres Entwicklungspotenzial in der Anwendung: Denkbar wäre ein Applikationssystem für Injektionen, bei dem der Patient selbst seine Falten wegspritzen kann. Bis es dazu kommt, wird allerdings noch einige Zeit vergehen. Fakt ist, dass die vom Arzt verabreichte Spritze immer noch die besten Resultate liefert.

[008] Vielleicht könnte auch die Nanotechnologie in Zukunft helfen, noch bessere Botulinumprotein-Spritzen für die Faltenbehandlung anzubieten.



Dokument D2

WO 2008/34445422

[001] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung proteinhaltiger Nanoemulsionen zur Verfügung, die in der kosmetischen, pharmazeutischen oder Lebensmittelindustrie Verwendung finden.

[002] Emulsionen, in denen die Emulsionströpfchen einen durchschnittlichen Tröpfchendurchmesser von weniger als 1000 nm haben, werden Nanoemulsionen genannt. Sie unterscheiden sich durch ihren geringen Tröpfchendurchmesser deutlich von herkömmlichen Emulsionen, die durchschnittliche Tröpfchendurchmesser von 2000 bis 5000 nm aufweisen. Nanoemulsionen haben häufig eine erhöhte Stabilität und/oder Wirksamkeit.

[003] Eine Vielzahl von Proteinen kann in dem Verfahren verwendet werden, darunter Insulin, Wachstumsfaktoren, Hormone, Milchproteine wie Kasein, bakterielle Proteine wie das Botulinumprotein oder pflanzliche Proteine.

[004] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Nanoemulsion. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Botulinumprotein in dem Verfahren verwendet. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur kosmetischen Faltenbehandlung, bei dem eine Botulinumprotein-haltige Nanoemulsion auf das Gesicht einer Person aufgetragen wird.

[005] Die Nanoemulsionen werden allgemein dadurch hergestellt, dass eine wässrige Phase und eine Ölphase miteinander vermischt werden und die Mischung hohen Scherkräften ausgesetzt wird. Die Scherkräfte werden beispielsweise durch hohen Druck, Kavitation und/oder Mikrofluidisierung erzeugt. Der verwendete Druck liegt dabei bei 1000 bar oder höher (zwischen 1200 und 2000 bar, in besonderen Fällen auch noch höher). In einer besonderen Ausführungsform werden die beiden Phasen einer Mikrofluidisierung ausgesetzt, die sich über einen Zeitraum von weniger als 10 Minuten erstreckt, vorzugsweise von weniger als 7, 6, 5, 4 oder 3 Minuten. Ganz besonders bevorzugt ist ein Zeitraum von 2 Minuten oder weniger.



[006] Die so erhaltenen Nanoemulsionen bestehen aus Tröpfchen, die einen Durchmesser von weniger als 1000 nm, 500 nm, 300 nm, 200 nm oder 100 nm haben.

[007] Die wässrige Phase kann beispielsweise Wasser, eine Salzlösung, eine Ethanol-Wasser-Lösung oder eine Glukoselösung sein. Beispielhafte Ölphasen sind Palmöl, Mandelöl, Sonnenblumenöl, Sojaöl, Olivenöl, Avokadoöl oder jedes andere Öl, oder auch Pflanzenöle, die mit Polyethylenglykol modifiziert sind, soweit sie für die kosmetische und pharmazeutische Verwendung geeignet sind. Man vermischt die zwei Phasen, wobei üblicherweise die wässrige Phase 70 vol% bis 99 vol%, 80 vol% bis 99 vol% oder 90 vol% bis 99 vol% ausmacht. In einer Ausführungsform macht die Ölphase 1 vol% bis 30 vol% aus, bevorzugt 1 vol%, 2 vol%, 3 vol%, 4 vol%, 5 vol%, 6 vol%, 7 vol%, 8 vol%, 9 vol% oder 10 vol%.

[008] Zu der Ölphase können weiterhin oberflächenaktive Stoffe gegeben werden, wie Lecithin, Phospholipide, Polysorbat oder Stearylamin. Dabei ist das Verhältnis von oberflächenaktiver Substanz zu Öl zwischen 1:1 und 1:5. In einigen Ausführungsformen ist das Verhältnis oberflächenaktiver Substanz zu Öl 1:1, 1:2, 1:2,5 oder 1:3.

[009] Beispiel 1

Dieses Beispiel zeigt ein Ausführungsbeispiel für eine Nanoemulsion, die mittels Mikrofluidisierung hergestellt wird und ein Botulinumprotein enthält.

100 g Polysorbat und 250 g Sojaöl wurden gemischt und auf 40°C erwärmt. 1 mg Botulinumprotein wurden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Diese wässrige Lösung wurde zu der Sojaöl-Polysorbat-Mischung gegeben. Nach dem Rühren wurde die Mischung einem Druck von 1500 bar in einem Mikrofluidizer für 2 Minuten ausgesetzt. Die resultierende Nanoemulsion wurde hinsichtlich der Tröpfchengröße analysiert. Man erhielt hauptsächlich Tröpfchen mit Durchmessern von 200 nm, 100 nm und 300 nm.



[010] Beispiel 2

Dieses Beispiel zeigt, dass das Protein in der Nanoemulsion die Haut passieren kann und seine Aktivität behält. Die Botulinumprotein-haltige Nanoemulsion aus Beispiel 1 wurde in einen gleichen Teil einer im Handel erhältlichen Creme eingerührt. Von dieser Botulinumprotein-haltigen Nanoemulsions-Creme werden 0,7 ml mittels einer Pipette auf die Stirn der weiblichen Versuchsperson mit ausgeprägten Stirnfalten aufgetragen und in die Haut einmassiert, bis keine Creme mehr sichtbar ist. Die Stirn wurde dann nach 1 Tag und danach nach 1 Woche, 2 Wochen, 4 Wochen, 8 Wochen und 12 Wochen beobachtet und mittels Foto- und Videoaufnahmen verglichen.

[011] Resultat

Innerhalb einer Woche war der behandelte Gesichtsmuskel gelähmt und es trat eine Faltenverminderung um 80% ein. Nach 2 Wochen zeigte sich ein Abschwächen der Wirkung, und nach 4 Wochen hatten sich die Falten fast vollständig wieder zurückgebildet. Nach spätestens 8 Wochen war kein Effekt mehr zu sehen. Innerhalb des untersuchten Zeitraums von 12 Wochen klagte die Versuchsperson über keine Nebenwirkungen wie Entzündungen oder Rötungen. Aus diesem Experiment lässt sich ablesen, dass die auf die Haut aufgetragene Nanoemulsion eine signifikante Wirkung zeigte, die in einem Zeitraum von ungefähr 2 Wochen vergleichbar war mit der erwarteten Wirkung einer Standardbehandlung mit injiziertem Botulinumprotein.

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Nanoemulsion, umfassend die folgenden Schritte:
 - (a) Mischen einer Ölphase und einer proteinhaltigen wässrigen Phase und gegebenenfalls eines oberflächenaktiven Stoffes und
 - (b) Aussetzen der Mischung einem Druck von mehr als 1000 bar.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei als Protein Botulinumprotein verwendet wird.
3. Verfahren zur kosmetischen Faltenbehandlung, bei dem eine Botulinumprotein-haltige Nanoemulsion auf das Gesicht einer Person aufgetragen wird.

