

## EXAMEN EUROPEEN DE QUALIFICATION 2015

# Epreuve A(Ch)

## Chimie

Cette épreuve contient :

- |                       |                     |
|-----------------------|---------------------|
| * Lettre du demandeur | 2015/A(Ch)/FR/1-7   |
| * Document D1         | 2015/A(Ch)/FR/8-9   |
| * Document D2         | 2015/A(Ch)/FR/10-12 |



**Lettre du demandeur**

La Lisse  
Faltenberger Weg 18  
Rimpelstein, Autriche

**[001]** Notre entreprise spécialisée dans les soins pour la peau a tout particulièrement travaillé sur la formation des rides. Ayant mis au point des produits et procédés nouveaux qui nous semblent innovants, nous souhaitons les faire breveter.

**[002]** Les rides du visage sont un signe de vieillissement de la peau. Il y a plusieurs façons d'atténuer les rides du visage. On peut citer par exemple les crèmes pour le visage, les liftings, et l'injection de protéines botuliques comme celle bien connue sous le nom de BOTOX®.

**[003]** L'injection directe de protéine botulique dans les muscles du visage est une des mesures les plus efficaces pour atténuer les rides. L'injection doit toutefois être effectuée par un personnel qualifié, en règle générale par un médecin spécialiste, et elle peut être ressentie comme douloureuse par certains patients. En outre, l'effet de la protéine botulique diminuant considérablement avec le temps, le traitement doit généralement être répété tous les trois à six mois.

**[004]** Nous nous sommes interrogés sur la manière de faire pénétrer la protéine botulique à travers la peau jusqu'au muscle facial, par application locale sur le visage, sans intervention médicale. Comme vous le savez, la peau est assez épaisse et protège l'organisme contre la déshydratation et la pénétration de substances nuisibles. La plupart des composés sont incapables de traverser la peau pour arriver au muscle.

**[005]** Nous avons constaté que la protéine botulique peut traverser la peau et parvenir directement au point d'apparition des rides si elle est couplée à un polymère et/ou se présente sous forme de nano-émulsion. La protéine botulique peut par exemple être couplée au polyéthylène glycol (PEG). Les fabricants de PEG sont connus et fournissent un produit au degré de pureté requis.



**[006]** La masse moléculaire moyenne du PEG est normalement située entre 200 et 35000 daltons. Les différents polyéthylène glycols sont désignés en fonction de leur masse moléculaire moyenne. Le PEG-5000, par exemple, a une masse moléculaire moyenne de 5000 daltons. La durée d'action de la protéine botulique dans le corps peut être considérablement prolongée lorsque la protéine botulique est couplée avec le PEG.

**[007]** Nous avons constaté que seuls le conjugué protéine botulique – PEG avec des PEG de poids moyen ont une durée d'action prolongée dans l'organisme et se prêtent au traitement des rides. Dans cette demande, les PEG de poids moyen désignent les PEG dont la masse moléculaire moyenne est située entre 2000 et 15000 daltons, la préférence allant aux PEG entre 2000 et 10000 daltons, et tout particulièrement aux PEG de 5000 daltons.

**[008]** Nous avons aussi couplé la protéine botulique à d'autres polymères, plus précisément la polyvinylpyrrolidone et l'acide hyaluronique. Lors de la sélection des conjugués destinés au traitement des rides, il faut absolument qu'en plus de présenter un effet antirides significatif, les conjugués soient bien tolérés par la peau et ne causent pas d'inflammations, d'éruptions cutanées, de desquamation ou déclenchent des allergies. Une légère rougeur qui disparaît d'elle-même quelques heures après l'application est cependant acceptable.

**[009]** Pour obtenir une nano-émulsion appropriée, on utilise la protéine botulique seule ou conjuguée à un polymère. Dans une nano-émulsion, les gouttelettes émulsionnées ont un diamètre moyen inférieur à 1000 nm. Ce faible diamètre moyen des gouttelettes distingue nettement les nano-émulsions des émulsions classiques, dont le diamètre moyen des gouttelettes est supérieur à 2000 nm.

**[010]** Les procédés pour obtenir des nano-émulsions sont connus. Le diamètre moyen des gouttelettes dans la nano-émulsion est d'au plus 1000 nm, avec une préférence pour un diamètre inférieur à 500 nm ou à 200 nm, et une plus grande préférence encore pour un diamètre d'environ 100 nm.



**[011]** Pour obtenir un effet constant, il est avantageux que les gouttelettes dans la nano-émulsion soient toutes de même taille. Il est également avantageux que la nano-émulsion ne contienne pas de gouttelettes de grande taille, par exemple celles de diamètre dépassant 500 nm.

**[012]** L'homme du métier sait que les procédés pour obtenir des nano-émulsions utilisent au moins deux phases non miscibles, l'une aqueuse et l'autre huileuse. La phase aqueuse peut dans notre cas être par exemple de l'eau, une solution saline ou un mélange éthanol-eau. Parmi les phases huileuses possibles, on retiendra les huiles de palme, d'amande, de tournesol, de soja, d'olive, l'huile de silicone, d'avocat, ou n'importe quelle autre huile adaptée à un usage cosmétique. La phase huileuse peut en outre contenir des agents tensioactifs tels que la lécithine, les phospholipides, le polysorbate, ou la stéarylamine, avec une préférence pour la lécithine en raison de sa bonne tolérance. La protéine botulique ou son conjugué sont ajoutés à la phase aqueuse.

**[013]** Des forces de cisaillement élevées sont nécessaires pour produire des nano-émulsions. Il existe pour ce faire des procédés connus, par exemple l'homogénéisation à haute pression. Dans notre entreprise, nous utilisons un microfluidiseur pour l'homogénéisation à haute pression. Notre procédé pour obtenir une nano-émulsion exige de mélanger les deux phases puis de les soumettre à une pression d'au moins 1000 bars, pendant 30 secondes au minimum et 10 minutes au maximum. Pour obtenir des gouttelettes d'un diamètre moyen inférieur à 500 nm, il s'est révélé avantageux de soumettre le mélange des deux phases à une pression allant de 1500 à 2000 bars.

**[014]** Lors de la préparation des nano-émulsions, nous avons constaté que la composition des phases utilisées dans le procédé avait une incidence sur la distribution de la taille des gouttelettes. On mélange deux phases, la phase aqueuse représentant au moins 90 % en volume et la phase huileuse 10 % en volume ou moins. Le rapport pondéral entre les agents tensioactifs et l'huile est de 2:1 ou plus, par exemple 2,5:1 ou 3:1. Si on soumet le mélange des deux phases aux pressions élevées avantagées dont il est question plus haut, on obtient des gouttelettes de même taille, avec un diamètre de 100 nm +/- 10 nm.



**[015]** On mélange les conjugués de protéine botulique et/ou les nano-émulsions à une crème disponible dans le commerce. Cette crème contenant la protéine botulique est de préférence appliquée à l'aide d'une pipette sur la partie de la peau du visage à traiter, de manière à conduire à une application la plus ciblée possible sur la surface de la peau. On se servira par exemple de pipettes en polyéthylène jetables, à soufflet intégré, d'un volume nominal de 1 à 10 ml. Ce type de pipettes jetables est commercialisé par notre filiale Easycare, Inc., sous la marque CANULETTA. Les pipettes appropriées peuvent être vendues en kit avec notre crème.

**[016]** Toutes les crèmes connues de l'homme du métier peuvent servir à préparer la crème contenant la protéine botulique. On peut y ajouter des ingrédients, par exemple des épaississants, des colorants, des parfums, des conservateurs, ou encore d'autres substances ayant un effet lissant sur les rides, comme la vitamine C, le rétinol, le collagène ou le coenzyme Q.

**[017]** En règle générale, la crème contenant la protéine botulique est appliquée tous les un à quatre mois. Pour les rides modérément prononcées, on recommande de renouveler l'application tous les deux mois. Si les rides sont très prononcées, la crème peut également être appliquée une fois par mois.

Les exemples ci-dessous illustrent notre invention.

### **[018] Exemple 1**

#### Préparation du conjugué de protéine botulique

On ajoute 7,5 mg de PEG-5000 ou de PEG-10000 à 1,5 mg de protéine botulique et on laisse agiter pendant toute une nuit à température ambiante. Des conjugués de protéine botulique avec la polyvinylpyrrolidone ou l'acide hyaluronique sont préparés de façon analogue.

### **[019] Exemple 2**

#### Préparation d'une crème contenant de la protéine botulique

5 mg d'un des conjugués de protéine botulique de l'exemple 1 ou 1 mg de protéine botulique non conjuguée sont mélangés à 350 g d'une crème disponible dans le commerce.



**[020] Exemple 3**Préparation d'une crème à nano-émulsion

Pour préparer une nano-émulsion, on mélange 250 g de lécithine et 100 g d'huile d'amande dans un rapport pondéral de 2,5 : 1, puis on chauffe à 40°C. On dilue 5 mg d'un des conjugués de protéine botulique et de polymère selon l'exemple 1 ou 1 mg de protéine botulique non conjuguée, dans 100 ml d'eau distillée. On ajoute cette solution aqueuse au mélange de lécithine et d'huile d'amande. Après agitation, on soumet le mélange à une pression de 1500 bars dans un microfluidiseur, pendant 2 minutes. On mélange la nano-émulsion ainsi obtenue à une crème disponible dans le commerce, dans un rapport 1:1. Le tableau 1 indique le diamètre moyen des gouttelettes, mesuré par diffusion dynamique de la lumière.

**Tableau 1**

Composition	Rapport pondéral lécithine:huile d'amande	Diamètre moyen des gouttelettes [nm]
Protéine botulique (non conjuguée)	1:1	550
Protéine botulique (non conjuguée)	2,5:1	110
Protéine botulique conjuguée au PEG-5000	1:1	500
Protéine botulique conjuguée au PEG-5000	2,5:1	90

**[021] Exemple 4**

Cinq volontaires âgés de 50 à 60 ans et présentant des rides prononcées sur le front se sont vu appliquer la crème contenant de la protéine botulique selon l'exemple 2 ou la crème à nano-émulsion selon l'exemple 3 contenant la protéine botulique. Au moyen d'une pipette, on applique sur le front d'un volontaire 0,5 à 0,8 ml de chacune des crèmes et on masse pour faire pénétrer, jusqu'à ce que plus aucune crème ne soit visible. Après un jour, puis chaque semaine pendant 4 mois, le front est observé et comparé au moyen de photographies et d'enregistrements vidéo. La réduction des rides après 2 semaines/4 semaines/8 semaines/12 semaines et les effets secondaires éventuels sont indiqués au tableau 2 pour la crème contenant de la protéine botulique, et au tableau 3 pour la crème à nano-émulsion contenant la protéine botulique.



**Tableau 2 : crème contenant de la protéine botulique**

Composition	Polymère utilisé	Réduction des rides en % après (2/4/8/12) semaines	Effets secondaires
1	-	10/0/0/0	Aucun
2	PEG-5000	35/35/30/25	Légère rougeur pendant 1 heure
3	PEG-10000	35/30/25/20	Aucun
4	Polyvinylpyrrolidone	50/50/40/40	Forte éruption cutanée sur le front pendant 1 semaine
5	Acide hyaluronique	5/0/0/0	Aucun

**Tableau 3 : crème à nano-émulsion contenant la protéine botulique**

Composition	Polymère utilisé	Réduction des rides en % après (2/4/8/12) semaines	Effets secondaires
6	-	45/30/20/10	Aucun
7	PEG-5000	60/55/50/35	Aucun
8	PEG-10000	50/50/40/30	Aucun
9	Polyvinylpyrrolidone	90/80/60/40	Desquamation au niveau du front
10	Acide hyaluronique	15/10/0/0	Aucun

Les tests montrent que l'utilisation des crèmes qui contiennent la protéine botulique conjuguée au PEG conduit à un taux de réduction acceptable des rides, avec aucun effet secondaire ou de très légers. Un taux de réduction des rides de moins de 20 % n'est pas acceptable.

**[022]** Nous attirons votre attention sur les documents D1 et D2 ci-joints.



**[023]** Nos concurrents sur le marché étant très dynamiques, nous vous saurions gré de déposer la demande dans les plus brefs délais. Nous ne sommes pas disposés à payer des taxes de revendication.

Sincères salutations,

Beppo Dellaruga



**Document D1**

**Bulletin d'information des professionnels de la cosmétique, décembre 2013**

**[001]** Les gens attentifs à leur apparence connaissent depuis des années la firme brésilienne ESTATICA et sa crème de soins du visage KENTORA. Cette crème contenant de la protéine botulique a fait ses preuves dans le lissage des rides superficielles du visage. Les injections de protéine botulique sont cependant incontournables lorsqu'il s'agit de traiter les rides plus profondes.

**[002]** C'est pourquoi ESTATICA a étendu ses activités au marché lucratif du traitement par injections des rides profondes. ESTATICA vient de réaliser une percée décisive dans le traitement antirides : alors que des injections de protéine botulique étaient jusqu'à présent nécessaires tous les 3 à 6 mois, les patients n'auront désormais plus à subir cette épreuve qu'environ une fois par an. Les chercheurs de cette société sont parvenus à prolonger la durée de l'effet de la célèbre protéine botulique en la couplant à un polymère.

**[003]** TEEN-KAR, le produit à base de protéine botulique désormais proposé, comprend la protéine botulique conjuguée à un polyéthylène glycol du groupe des polyéthylène glycols dits de « poids moyen » (de masse moléculaire moyenne entre environ 2500 et environ 15000 daltons). TEEN-KAR est proposé sous forme de solution aqueuse.

**[004]** Des tests réalisés avec 50 utilisateurs ont confirmé que le produit est bien toléré par la peau et n'entraîne pas d'effets secondaires notables après l'injection.

**[005]** Chez la plupart des sujets, l'effet s'est maintenu pendant au moins 10 mois, un traitement de rappel étant conseillé après 12 mois. Dans des cas isolés, les rides ne sont vraiment réapparues qu'au bout de 14 mois à compter de l'injection. C'est là un succès que les autres fabricants de protéine botulique injectable n'ont jusqu'à présent pu égaler. TEEN-KAR arrivera sur le marché lors des prochaines semaines.

**[006]** ESTATICA entend élargir davantage encore sa gamme de produits et augmenter l'efficacité de ses produits à base de protéine botulique. D'autres polymères pourraient être utilisés à la place du polyéthylène-glycol.



**[007]** Le patron d'ESTATICA, Manuel da Silva, entrevoit d'autres développements au niveau de l'application : on peut en effet imaginer un système d'application où le patient traiterait lui-même ses rides en s'auto-injectant le produit. Nous n'en sommes toutefois pas encore là, une injection par le médecin offrant actuellement toujours les meilleurs résultats.

**[008]** Les nanotechnologies contribueront peut-être, à l'avenir, au développement d'injections de protéine botulique plus performantes pour le traitement antirides.



**Document D2**

**WO 2008/34445422**

**[001]** La présente invention fournit un procédé pour fabriquer des nano-émulsions contenant des protéines, destinées à être utilisées dans les industries cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires.

**[002]** On appelle nano-émulsions les émulsions dont les gouttelettes émulsionnées ont un diamètre moyen inférieur à 1000 nm. Ce faible diamètre des gouttelettes distingue nettement les nano-émulsions des émulsions classiques, dont le diamètre moyen des gouttelettes va de 2000 à 5000 nm. Les nano-émulsions ont souvent une stabilité et/ou une efficacité accrues.

**[003]** De nombreuses protéines, dont l'insuline, les facteurs de croissances, les hormones, les protéines laitières comme la caséine, les protéines bactériennes comme la protéine botulique, ou encore les protéines végétales peuvent être utilisées pour le procédé.

**[004]** L'invention concerne un procédé pour obtenir une nano-émulsion. Dans un mode de réalisation préféré, la protéine botulique est utilisée dans le procédé. L'invention porte aussi sur un procédé de traitement cosmétique des rides, dans lequel une nano-émulsion contenant de la protéine botulique est appliquée sur le visage d'une personne.

**[005]** Pour préparer les nano-émulsions, une phase aqueuse et une phase huileuse sont généralement mélangées puis le mélange est soumis à des forces de cisaillement élevées. Ces forces de cisaillement sont par exemple obtenues par haute pression, cavitation et/ou microfluidisation. On a recours à des pressions de 1000 bars ou plus (entre 1200 et 2000 bars, ou bien plus élevées encore dans certains cas). Dans un des modes de réalisation, les deux phases sont soumises à une microfluidisation pendant moins de 10 minutes, de préférence pendant moins de 7, 6, 5, 4 ou 3 minutes. La préférence va tout particulièrement à une microfluidisation de 2 minutes ou moins.



**[006]** Les nano-émulsions ainsi obtenues sont constituées de gouttelettes dont le diamètre est inférieur à 1000 nm, 500 nm, 300 nm, 200 nm ou 100 nm.

**[007]** La phase aqueuse peut par exemple être de l'eau, une solution saline, une solution eau-éthanol ou une solution de glucose. La phase huileuse peut par exemple contenir de l'huile de palme, d'amande, de tournesol, de soja, d'olive, d'avocat, ou n'importe quelle huile ainsi que les huiles végétales modifiées avec du polyéthylène glycol, pour autant qu'elles se prêtent à un usage cosmétique et pharmaceutique. On mélange les deux phases, la phase aqueuse ayant généralement une teneur volumique de 70 % à 99 %, 80 % à 99 % ou 90 % à 99 %. Dans un des modes de réalisation, la phase huileuse a une teneur volumique de 1 % à 30 %, préférentiellement de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % ou 10 %.

**[008]** À la phase huileuse, on peut ajouter un agent tensioactif tel que la lécithine, les phospholipides, le polysorbate, ou la stéarylamine. Le rapport entre l'agent tensioactif et l'huile est alors situé entre 1:1 et 1:5. Dans certains modes de réalisation, le rapport entre l'agent tensioactif et l'huile est égal à 1:1, 1:2, 1:2,5 ou 1:3.

#### **[009] Exemple 1**

Cet exemple concerne un mode de réalisation d'une nano-émulsion fabriquée par microfluidisation et contenant une protéine botulique. On mélange 100 g de polysorbate et 250 g d'huile de soja, puis on chauffe à 40°C. On dilue 1 mg de protéine botulique dans 100 ml d'eau distillée. On ajoute cette solution aqueuse au mélange de polysorbate et d'huile de soja. Après agitation, on soumet le mélange à une pression de 1500 bars pendant 2 minutes, dans un microfluidiseur. La taille des gouttelettes de la nano-émulsion résultante a été analysée. Les diamètres des gouttelettes obtenues étaient essentiellement de 200 nm, 100 nm et 300 nm.



### **[010] Exemple 2**

Cet exemple montre que la protéine de la nano-émulsion est capable de traverser la peau tout en conservant son activité. La nano-émulsion contenant de la protéine botulique de l'exemple 1 est mélangée, en proportion identique, à une crème disponible dans le commerce. Au moyen d'une pipette, on applique sur le front d'une volontaire de sexe féminin présentant des rides prononcées sur le front 0,7 ml de crème contenant la nano-émulsion et on masse pour faire pénétrer, jusqu'à ce que la crème ne soit plus visible. Après un jour, puis au bout de 1 semaine, 2 semaines, 4 semaines, 8 semaines et 12 semaines, l'état du front est observé et comparé au moyen de photographies et d'enregistrements vidéo.

### **[011] Résultat**

En l'espace d'une semaine, le muscle facial traité a été paralysé et les rides ont régressé de 80 %. L'effet faiblit au bout de 2 semaines et après 4 semaines, les rides se sont presque totalement reconstituées. Au plus tard après 8 semaines, il n'y avait plus aucun effet visible. La volontaire ne s'est plainte d'aucun effet secondaire tel qu'une inflammation ou une rougeur pendant les 12 semaines d'observation. L'expérience montre que la nano-émulsion appliquée sur la peau a, pendant environ 2 semaines, un effet notable qui est comparable à celui que l'on attend d'un traitement classique par injection de protéine botulique.

### **Revendications**

1. Procédé pour obtenir une nano-émulsion, comprenant les étapes suivantes :
  - (a) on mélange une phase huileuse et une phase aqueuse contenant une protéine, et éventuellement un agent tensioactif et
  - (b) on soumet le mélange à une pression de plus de 1000 bars.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la protéine utilisée est la protéine botulique.
3. Procédé de traitement cosmétique des rides, dans lequel une nano-émulsion contenant de la protéine botulique est appliquée sur le visage d'une personne.

