

PRÜFUNGSARBEIT EINES BEWERBERS

Paper A (Chemie), EQE 2015

Anspruch 1

Nanoemulsion enthaltend eine wässrige Phase, eine Ölphase und ein Botulinumprotein-Polyethylenglycol-Konjugat, wobei das in dem Konjugat enthaltene Polyethylenglycol eine mittlere Molekularmasse von 2000 bis 15000 Dalton aufweist und wobei die die Nanoemulsion bildenden Emulsionströpfchen einen durchschnittlichen Tröpfchendurchmesser von weniger als 1000 nm, gemessen durch dynamische Lichtstreuung, aufweisen.

Anspruch 2

Nanoemulsion nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Emulsionströpfchen alle gleich groß sind.

Anspruch 3

Nanoemulsion nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der durchschnittliche Tröpfchendurchmesser der Emulsionströpfchen max. 500 nm beträgt, gemessen durch dynamische Lichtstreuung.

Anspruch 4

Verfahren zur Herstellung von Nanoemulsionen, die ein Botulinumprotein-Polyethylenglycol-Konjugat enthalten, mit den folgenden Schritten:

- Bereitstellen einer wässrigen Phase und einer Ölphase
- Zugabe eines Botulinumprotein-Polyethylenglycol-Konjugats zu der wässrigen Phase
- vermischen der wässrigen Phase und der Ölphase
- Druckbehandlung der wässrigen Phase und der Ölphase für einen Zeitraum von 30 Sekunden bis 10 Minuten, wobei der Druck mindestens 1000 bar beträgt.

Anspruch 5

Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Phase Wasser, eine Salzlösung und/oder ein Ethanol-Wasser-Gemisch umfasst.

Anspruch 6

Verfahren nach einem der Ansprüche 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Ölphase Palmöl, Mandelöl, Sonnenblumenöl, Sojaöl, Olivenöl, Silikonöl, Avocadoöl oder Mischungen dieser umfasst.

Anspruch 7

Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Ölphase einen oberflächenaktiven Stoff, ausgewählt aus der Gruppe, die Lecithin, Phospholipide, Polysorbat und Stearylamin umfasst, enthält.

Anspruch 8

Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der oberflächenaktive Stoff Lecithin ist.

Anspruch 9

Creme enthaltend eine Nanoemulsion nach einem der Ansprüche 1 bis 3.

Anspruch 10

Creme enthaltend ein Botulinumprotein-Polyethylenglycol-Konjugat, wobei das in dem Konjugat enthaltene Polyethylenglycol eine mittlere Molekularmasse von 2000 bis 15000 Dalton aufweist.

Anspruch 11

Creme nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Creme weiterhin Verdickungsmittel, Farbstoffe, Duftstoffe, Konservierungsmittel, Vitamin C, Retinol, Kollagen und/oder Coenzym Q enthält.

Anspruch 12

Creme nach einem der Ansprüche 9 bis 11 zur Anwendung in einem Verfahren zur kosmetischen Faltenbehandlung.

Anspruch 13

Kit-of-parts umfassend eine Pipette und Creme nach einem der Ansprüche 9 bis 12.

Anspruch 14

Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Druck 1500 bis 2000 bar beträgt.

Anspruch 15

Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 8 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Phase mindestens 90 vol% ausmacht und die Ölphase max. 10 vol% ausmacht und/oder das Gewichtsverhältnis von oberflächenaktivem Stoff zu Öl mindestens 2:1 beträgt.

Beschreibungseinleitung

Die Erfindung betrifft eine Nanoemulsion enthaltend ein Botulinumprotein-Polyethylenglycol-Konjugat, ein Verfahren zu deren Herstellung und eine Creme, die die Nanoemulsion enthält. Außerdem betrifft die Erfindung auch eine Creme, die ein Botulinumprotein-Polyethylenglycol-Konjugat enthält, sowie ein Kit-of-parts umfassend eine Pipette und eine der vorgenannten Cremes. Weiterhin betrifft die Erfindung auch die vorgenannten Cremes zur Anwendung in einem Verfahren zur kosmetischen Faltenbehandlung.

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®.

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.

Die D1 beschreibt zur Faltenbehandlung das Botulinumpräparat TEEN-KAR. Dieses wird als wässrige Lösung angeboten und enthält ein Konjugat von Botulinumprotein und einem Polyethylenglycol mit einer mittleren Molekularmasse von etwa 2500 bis 15000 Dalton. Das Präparat der D1 ist jedoch ebenfalls ein Präparat zur injektösen Behandlung, welche durch einen Arzt durchgeführt werden muss.

Es wäre jedoch erstrebenswert, das Botulinumprotein ohne ärztliches Zutun zur Faltenreduzierung auf der Haut anzuwenden. Bekanntermaßen ist die Haut allerdings recht dick und verhindert die Austrocknung des Körpers sowie das Eindringen schädlicher Substanzen in den Körper. Die meisten Verbindungen sind daher nicht in der Lage die Haut zu durchdringen, um durch die Haut zum Gesichtsmuskel zu gelangen.

Vor diesem Hintergrund beschreibt die D2 die Herstellung proteinhaltiger Nanoemulsionen, die in der kosmetischen, pharmazeutischen oder Lebensmittelindustrie Verwendung finden sollen. Insbesondere beschreibt die D2 auch ein Verfahren zur kosmetischen Faltenbehandlung, bei dem eine Botulinumprotein-haltige Nanoemulsion auf das Gesicht einer Person aufgetragen wird. Gemäß Beispiel 2 der D2 kann die Botulinumprotein-haltige Nanoemulsion auch in eine herkömmliche Creme eingerührt und zur Faltenreduzierung auf die Haut aufgetragen werden. Die anfänglich gute Wirkung schwächte jedoch bereits nach 2 Wochen ab, sodass die Falten bereits nach 4 Wochen fast vollständig zurückgebildet waren und nach 8 Wochen gar kein Effekt mehr zu sehen war.

An der Methode der D1 ist daher nachteilig, dass die Applikation nur durch einen Arzt durchgeführt werden kann.

An der Methode der D2 ist dagegen nachteilig, dass die Wirkung in der Faltenreduktion bereits nach kurzer Zeit, d.h. nach 2-4 Wochen, abschwächt oder kaum noch wahrnehmbar ist.

Es war somit die Aufgabe der Erfindung, eine Botulinumprotein-haltige Zusammensetzung bereitzustellen, die vom Anwender selbst zur Reduzierung von Fältchen auf die Haut aufgetragen werden kann und deren Wirkungsdauer im Vergleich zu der aus D2 bekannten Zusammensetzung erheblich erhöht ist.

Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Nanoemulsion enthaltend ein Botulinumprotein-PEG-Konjugat nach Anspruch 1 und durch eine diese Nanoemulsion enthaltende Creme.

Vorliegend wurde gefunden, 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.

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.

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.

Eine geeignete Nanoemulsion kann 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele veranschaulicht.

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.

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.

Beispiel 3

Herstellung 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

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

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

Nanoemulsions-Creme aufgeführt.

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

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.

Examination Committee I: Paper A Ch 2015 - Marking Details			Candidate No	
Category		Maximum possible	Marks awarded	
			Marker 027	Marker 006
Independent claims	Nanoemulsion comprising a	25	25	25
Independent claims	Cream comprising the	25	25	25
Independent claims	Method for cosmetic treatment;	20	11	11
Dependent claims	Dependent claims	15	8	8
Description	Description	15	14	14
Total			83	83
Examination Committee I agrees on 83 points and recommends the grade PASS				