

EUROPÄISCHE EIGNUNGSPRÜFUNG 2014

Aufgabe A(Ch)

Chemie

Diese Prüfungsaufgabe enthält:

- | | | |
|---|-------------------------|---------------------|
| * | Schreiben des Anmelders | 2014/A(Ch)/DE/1-8 |
| * | Dokument D1 | 2014/A(Ch)/DE/9-10 |
| * | Dokument D2 | 2014/A(Ch)/DE/11-13 |



SCHREIBEN DES ANMELDERS

ProtStab Ltd.
N.O. DeNature Street 12
Stayinshape City

Sehr geehrter Herr Patentanwalt,

[001] wir sind ein kleines Biotechnologieunternehmen, das Proteinzusammensetzungen herstellt. In diesem Zusammenhang haben wir eine wichtige Erfindung gemacht, die für uns außerordentlich wertvoll ist. Bitte reichen Sie für den von uns erfundenen Gegenstand so bald wie möglich eine Patentanmeldung ein. Beachten Sie dabei, dass es unsere Firmenpolitik ist, keine Anspruchsgebühren zu zahlen.

[002] Beigefügt sind eine Beschreibung unserer Erfindung sowie zwei Dokumente des Stands der Technik, die für unsere Erfindung relevant erscheinen. Dokument D1 offenbart ein Verfahren, das dieselben Schritte umfasst wie unser Verfahren. Das ist bedauerlich, weil wir auch für dieses Verfahren Schutz begehren. Weil wir jedoch wissen, dass die Neuheit eines der Erfordernisse für die Erteilung eines Patents durch das Europäische Patentamt ist, erscheint es uns sehr unwahrscheinlich, dass dieses Verfahren geschützt werden kann. Sollten Sie jedoch eine Möglichkeit sehen, wie für dieses Verfahren dennoch Schutz erlangt werden kann, dann stellen Sie bitte sicher, dass dies geschieht. Dokument D2 offenbart Zusammensetzungen, die dieselben Proteine wie die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen umfassen.

[003] Wir haben ein Verfahren zur Auffindung von Lösungen entwickelt in denen Proteine ihre natürliche Struktur bewahren (stabilisierende Lösungen). Falls möglich, streben wir auch Schutz für stabilisierende Lösungen an, die mit dem genannten Verfahren gefunden werden.



[004] Cholera ist eine weltweit verbreitete Ansteckungskrankheit. Das Hauptsymptom der Cholera ist Diarrhö, die zu starker Dehydratisierung und Elektrolytverlust führt. Unbehandelt führt sie in 50 - 60 % der Fälle zum Tod des Erkrankten.

[005] Cholera wird durch Bakterien verursacht, die Proteine in den menschlichen Intestinaltrakt abgeben. Diese Proteine gehören zur Familie der bakteriellen Diarrhö-Proteine (BDP). Diese Proteinfamilie umfasst drei Typen von Proteinen, die jeweils eine Alpha-(A-)Untereinheit und entweder zwei, vier oder fünf Beta-(B-)Untereinheiten enthalten. Die genannten drei Typen von BDP-Proteinen werden deshalb AB2, AB4 und AB5 bezeichnet. Typische Proteine des Typs AB5 sind EcT (E. coli-Toxin) und CvT (Cholera vibrio-Toxin).

[006] Es ist zwar allgemein anerkannt, dass Proteine des Typs AB5 Cholera verursachen, ihr Wirkungsmechanismus ist jedoch noch zu erforschen. Die Forschung auf diesem Gebiet war bislang schwierig, weil Proteine des Typs AB5 sehr instabil sind und rasch funktionsunfähig werden. "Funktionsunfähig" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass der aus einer A- und fünf B-Untereinheiten bestehende Proteinkomplex zerfallen ist und damit seine natürliche dreidimensionale Struktur verloren hat. In diesem zerfallenen Zustand verliert das Protein des Typs AB5 seine natürlichen biologischen Wirkungen und kann nicht mehr für eine biochemische Analyse verwendet werden. Aus diesem Grund werden Proteine des Typs AB5 gewöhnlich in getrockneter Form aufbewahrt. Zur Verwendung wird das Protein in einer Standard-Salzlösung aufgelöst, bei 4 °C aufbewahrt und rasch verwendet.

[007] Es besteht also ein Bedarf, die derzeit verwendete Standard-Salzlösung durch eine stabilisierende Lösung zu ersetzen, in der das Protein des Typs AB5 seine natürliche komplexe Proteinstruktur über einen längeren Zeitraum bewahrt.



[008] Wir haben ein Verfahren entwickelt, mit dem der Anteil eines komplexierten Proteins des Typs AB5 in einer Probe bestimmt werden kann. Dies wird erreicht, indem eine Probe eines BDP-Proteins des Typs AB5 einer Säulenchromatographie unterzogen wird, wobei als Trägermaterial hydroxyliertes Polymethacrylat (HyPM) mit freien Carboxylgruppen verwendet wird.

[009] Bei unseren Versuchen haben wir die Ultrahydrogel-250-Säule (Waters Ltd.) in Form einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-(HPLC-)Säule verwendet. Die Ultrahydrogel-250 hat eine Partikelgröße von 6 μm und eine Porosität von 250 nm.

[010] Zur Trennung von komplexierten und zerfallenen Proteinen des Typs AB5 auf dem oben genannten Trägermaterial muss der folgende Puffer verwendet werden, um die Proteine zu eluieren: Tris-HCl 200 mM + Na_2SO_4 100 mM bei pH 7,2. Eine noch akzeptable Auflösung ergibt sich wenn der pH-Wert dieses Puffers von 6,8 bis 7,6 variiert. Jenseits dieser Grenzen konnten keine sinnvollen Ergebnisse erzielt werden.

[011] Proteine wurden während der Chromatographie durch eine fachübliche UV-Absorptionsspektroskopie nachgewiesen. Nur zwei Peaks waren nachweisbar, von denen einer der B5-Einheit und der andere AB5 in komplexierter Form entsprach. Somit konnten wir die Menge an Protein des Typs AB5 im komplexierten Zustand und im zerfallenen Zustand bestimmen und quantifizieren.

[012] Die Stabilität eines Proteins des Typs AB5 lässt sich in Form eines Stabilitätsfaktors (SF) ausdrücken. Der SF wurde berechnet als Quotient der Menge an komplexierten Protein des Typs AB5 geteilt durch die Gesamtmenge an AB5 + B5 (in %). Ein Protein des Typs AB5 galt als stabilisiert, wenn der SF über 70 %, vorzugsweise über 80 %, oder noch besser über 90 % beträgt.



[013] Die oben genannte Trennmethode ermöglicht es zum allerersten Mal, die Proteinkomplex-Stabilität eines Proteins des Typs AB5 quantitativ zu messen. Anhand dieser Methode haben wir ein Verfahren entwickelt, mit dem stabilisierende Lösungen ermittelt werden, die verglichen mit der derzeit verwendeten Standard-Salzlösung, zu einer verbesserten Stabilität eines Proteins des Typs AB5 führen.

[014] Der Begriff "stabilisierende Lösung" bezieht sich in diesem Zusammenhang auf eine wässrige Lösung, die ein oder mehrere stabilisierende Mittel enthält, die dazu beitragen, dass ein Protein des Typs AB5 seine komplexierte und somit biologisch aktive Form bewahrt.

[015] Ein Screening zur Ermittlung von stabilisierenden Mitteln gehört für den Fachmann auf dem Gebiet der Proteinformulierung zur Routine. Zum Beispiel kann ein potenzielles stabilisierendes Mittel aus Zuckern, Detergenzien oder Aminosäuren ausgewählt werden. Das Verfahren muss die folgenden Schritte umfassen: Inkubieren des Proteins des Typs AB5 in einer zu testenden stabilisierenden Lösung und Messung der Stabilität des Proteins des Typs AB5 wie weiter oben beschrieben.

[016] Die Inkubation der Probe kann von Stunden bis zu mehreren Tagen, Wochen oder gar Monaten dauern. Die Inkubation kann unter Kühlung (z. B. 4 °C) oder bei Raumtemperatur (zwischen 20 °C and 25 °C) stattfinden. Während der Inkubation kann die Probe entweder in einem statischen Zustand gehalten oder geschüttelt werden. Letzteres kann dazu dienen, den Zerfall der Komplexe zu beschleunigen, und somit die Inkubationszeit zu verkürzen.

[017] Ein Protein des Typs AB5 in einer stabilisierenden Lösung kann weiter auf biologische Aktivität getestet werden. Dies kann durch zahlreiche in-vivo- oder in-vitro-Tests erfolgen, die dem Fachmann wohlbekannt und z. B. in Yamaha (1992) J. Prot. Technol. beschrieben sind.



Beispiele**Beispiel 1: Trennung von AB5 und B5 von CvT durch Chromatographie**

[018] Bei diesem Versuch wurde kommerziell erhältlich, getrocknetes CvT in der Standard-Salzlösung aufgelöst und unter den in Tabelle 1 genannten Bedingungen inkubiert. Dann wurde die weiter oben beschriebene HPLC-Ultrahydrogel-250-Säule mit der Probe beladen und das Protein unter Verwendung des folgenden Puffers eluiert: Tris-HCl 200 mM + Na₂SO₄ 100 mM bei pH 7,0. Die Protein-Peaks wurden ermittelt und quantifiziert, und der Stabilitätsfaktor (SF) berechnet.

Tabelle 1

Inkubationsbedingungen	Stabilitätsfaktor (%) bei Inkubationstemperatur	
	4 °C	22 °C
1 Stunde, statisch	75	56
12 Stunden, statisch	61	33
24 Stunden, statisch	45	23
48 Stunden, statisch	37	18

[019] Die Daten in Tabelle 1 zeigen, dass das Protein rasch zerfällt, wenn es in der Standard-Salzlösung aufgelöst wird. Lagerung bei Raumtemperatur verstärkt dieses Problem erheblich.



Beispiel 2: Screening zur Ermittlung von stabilisierenden Lösungen für ein Protein des Typs AB5

[020] Lösungen wurden auf eine stabilisierende Wirkung auf den Proteinkomplex eines Proteins des Typs AB5 getestet. Wir verwendeten CvT als Protein des Typs AB5. CvT wurde mit 0,8 - 2,0 mg/ml verwendet. CvT wurde bei 4 °C für 12 Stunden in verschiedenen potenziellen stabilisierenden Lösungen unter den in Tabelle 2 genannten Bedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben anhand des Verfahrens aus Beispiel 1 analysiert. Die potenziellen stabilisierenden Lösungen entstammten einem kommerziell erhältlichen Protein-Stabilisierungs-Testkit.

Tabelle 2

Potenzielle stabilisierende Lösung		Stabilitätsfaktor	
		statisch	geschüttelt
1	PBS	55	45
2	PBS, Galaktose 0,1 mM	61	55
3	PBS, 0,25 Gew.-% CHAPS	95	89
4	Phosphatpuffer, pH 7,4	65	54
5	Phosphatpuffer, pH 7,4, Galaktose 0,2 M	64	52
6	Phosphatpuffer, pH 7,4, L-Arginin 0,4 M	88	82
7	Azetatpuffer, pH 5,5, NaCl 300 mM	62	43
8	Zitronensäurepuffer, pH 6,5	65	38
9	Tris-Puffer, pH 7,5, 1 mM EDTA	59	41
10	Tris-Puffer, pH 7,5, L-Arginin 0,4 M	59	39
11	Kontrolle: Standard-Salzlösung	61	42

[021] Die Daten in Tabelle 2 zeigen, dass zwei Lösungen (Nr. 3 und Nr. 6) CvT besonders wirksam stabilisieren. Diese stabilisierenden Lösungen wurden für weitere Analysen ausgewählt.



Beispiel 3: Wirkung von L-Arginin und CHAPS auf die CvT-Stabilität

[022] Die stabilisierende Wirkung der stabilisierenden Lösungen Nr. 3 und Nr. 6 wurde im Zeitverlauf (1, 2, 10, 30, 60 und 90 Tage) unter statischen Bedingungen untersucht. CvT wurde in einer Proteinkonzentration von 2,0 mg/ml eingesetzt und auf einer Temperatur von 2 - 8 °C in der stabilisierenden Lösung gehalten. Anhand des Verfahrens aus Beispiel 1 wurde die Proteinkomplex-Stabilität bestimmt und der Stabilitätsfaktor berechnet.

Tabelle 3

Stabilisierende Lösungen	Inkubationszeit (Tage)					
	1	2	10	30	60	90
Phosphatpuffer, pH 7,4 + 50 mM L-Arginin	86,5	87,5	88,8	87,0	85,5	84,0
Phosphatpuffer, pH 7,4 + 100 mM L-Arginin	88,8	87,2	85,6	90,5	83,4	82,2
Phosphatpuffer, pH 7,4 + 200 mM L-Arginin	86,3	88,3	83,7	83,5	81,2	82,4
Phosphatpuffer, pH 7,4 + 400 mM L-Arginin	85,8	88,8	88,3	87,2	85,3	83,9
PBS + 0,05 Gew.-% CHAPS	85,5	87,5	86,8	87,0	86,5	85,0
PBS + 0,15 Gew.-% CHAPS	90,8	89,2	88,6	88,5	88,4	88,2
PBS + 0,25 Gew.-% CHAPS	93,3	91,3	90,7	90,5	90,2	89,4
PBS + 0,35 Gew.-% CHAPS	90,7	88,8	88,3	87,2	90,3	87,9



[023] Die Daten in Tabelle 3 zeigen, dass sowohl CHAPS als auch L-Arginin in ihrem jeweiligen Puffer Proteine des Typs AB5 wie zum Beispiel CvT bis zu 90 Tage stabilisieren. Diese stabilisierende Wirkung wurde über ein breites Spektrum von pH-Werten beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Erhöhung der Menge an L-Arginin auf mehr als 50 mM verbesserte nicht die Proteinkomplex-Stabilität. Eine zufriedenstellende Stabilisierung wird erreicht, wenn L-Arginin in einer Menge von mindestens 10 mM verwendet wird. Der Proteinkomplex wird ebenfalls stabilisiert, wenn mindestens 0,05 Gew.-% CHAPS vorhanden ist. Bessere Ergebnisse werden jedoch mit mindestens 0,15 Gew.-% CHAPS erreicht.

Mit freundlichen Grüßen

Peter St. John



Dokument D1

Isolierung des homoduplex Proteins VIP2 aus S. Echinaceae

Hintergrund

[001] Das Protein VIP2 (Very Important Protein) besteht aus zwei identischen VIP-Untereinheiten, die das biologisch aktive VIP2 bilden. Dieses Protein stellt eine wichtige Komponente der Zellsignalwege von S. Echinaceae dar.

[002] Peters et al. (1998) stellten ein optimiertes Protokoll zur VIP2-Reinigung aus Zellextrakten von S. Echinaceae bereit. Dieses Proteinreinigungsprotokoll war jedoch nicht zufriedenstellend, da der erreichbare Proteinreinheitsgrad (etwa 94 %) ungenügend war.

[003] Wir sind daran gegangen, das bisher Erreichte zu verbessern. Ausgehend von dem Proteinextrakt, der mittels des Verfahrens von Peters et al. (1998) gewonnen wurde, unternahmen wir eine eingehende Analyse zahlreicher Möglichkeiten, die verbleibenden Verunreinigungen aus der VIP2 enthaltenden Probe zu eliminieren. Wir stellen nunmehr ein einfaches Verfahren vor, das auf der von Peters et al. (1998) entwickelten Strategie aufbaut, um VIP2 auf Reinheitsgrade von mindestens 99 % anzureichern.

Materialien und Verfahren

[004] Als Ausgangsmaterial verwendeten wir eine VIP2 enthaltende Probe, die nach dem von Peters et al. (1998) beschriebenen Verfahren hergestellt wurde.



[005] In Vorversuchen wurden zahlreiche kommerziell erhältliche Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-(HPLC-)Säulen getestet. Ein Durchbruch wurde schließlich erzielt bei Verwendung eines kommerziell erhältlichen hydroxylierten Polymethacrylat-(HyPM-)Materials mit freien Carboxylgruppen (Ultrahydrogel-250, erhältlich von Waters Ltd.) als Träger.

HPLC-Säulenchromatographie

[006] Puffer: Tris-HCl 200 mM + Na₂SO₄ 100 mM bei pH 7,2; Fluss: 0,5 ml/mm;
Detektion: UV-Absorptionsspektroskopie; Säule: Ultrahydrogel 250 (Waters Ltd.);
Trägermaterial: hydroxylierte Polymethacrylat (HyPM) mit freien Carboxylgruppen;
Partikelgröße: 6 µm; Porosität: 250 nm.

[007] Das Chromatogramm der nach diesem Verfahren eluierten Proteine wies einen einzelnen Peak auf, der dem VIP2-Dimer entspricht. Nachgewiesen wurde auch eine Reihe niedermolekularer Verunreinigungen, die klar von VIP2 getrennt waren. Die Identität von VIP2 wurde mittels Massenspektrometrie bestätigt.

Schlussfolgerung

[008] Wir legen erstmals ein Aufreinigungsprotokoll für VIP2 vor, das eine deutliche Verbesserung des Proteinreinheitsgrads von VIP2 gegenüber dem bisherigen Referenzverfahren von Peters et al. 1998 ermöglicht. Da ein Proteinreinheitsgrad von über 99 % erreicht ist, scheint die Zeit reif, die Biologie und Biochemie dieses für zelluläre Signalwege in S. Echinaceae wichtigen Proteins genauer zu untersuchen.



Dokument D2

Entgiftete Mutanten des Choleratoxins (CvT)

[001] Cholera ist eine weltweit verbreitete Ansteckungskrankheit. Sie wird durch Mikroorganismen wie Cholera vibrio (C. vibrio) verursacht. Das Hauptsymptom der Cholera ist schwere Diarrhö, die zu lebensbedrohender Dehydratisierung und Elektrolytverlust führt. Zwar kann Cholera durch kontrollierte und intensive Rehydratation wirksam geheilt werden, doch bleibt eine weitere Erforschung der Krankheit notwendig.

[002] C. vibrio verursacht Diarrhö durch die Sekretion des Cholera vibrio-Toxins (CvT). CvT gehört zur Familie der bakteriellen Diarrhö-Proteine (BDP), die drei Typen von Proteinen umfasst, die jeweils eine Alpha-(A-)Untereinheit und entweder zwei, vier oder fünf Beta-(B-)Untereinheiten enthalten. Die drei Typen von Proteinen werden deshalb als AB2, AB4 bzw. AB5 bezeichnet.

[003] Die Verwendung von Proteinen des Typs AB5 im Tiermodell, z. B. in Mäusen, Ratten und Kaninchen, hat sich wegen der inhärenten Toxizität dieser Proteine als schwierig erwiesen. Um diese Aufgabe zu lösen, wurden Proteine des Typs AB5 durch Vernetzungsmittel chemisch verändert, um ihren Toxizitätsgrad zu senken, wobei sie jedoch weiterhin Diarrhö verursachten.

[004] Mit der vorliegenden Erfindung stellen wir eine Alternativlösung für diese Aufgabe bereit. Wir haben entdeckt, dass CvT entgiftet werden kann, während seine Diarrhö verursachende Aktivität erhalten bleibt, wenn mindestens eine der folgenden Aminosäuren in der A-Untereinheit von CvT mutiert wird: Val-53 oder Ser-97.



[005] Der Begriff "entgiftet" wird hier in dem Sinne gebraucht, dass das Protein des Typs AB5 eine erheblich niedrigere Toxizität aufweist als das natürlich vorkommende Protein. Idealerweise sollte der Toxizitätsgrad weniger als 0,01 % desjenigen des natürlich vorkommenden Proteins betragen.

Beispiel: Entgiftetes CvT

[006] Das CvT-Gen wurde kloniert, und es wurden nach Standardverfahren Mutanten erzeugt. Das natürlich vorkommende Protein und die mutierten Proteine wurden erzeugt, und die Toxizität wurde nach dem von Jensen et al. in ToxProt. (1995) beschriebenen Verfahren bewertet.

[007] Proteine, die keine oder nur minimale Toxizität aufwiesen, wurden dann auf ihre Fähigkeit getestet, Diarrhö bei Mäusen hervorzurufen. Zu diesem Zweck wurden die Proteine gereinigt, abgeschieden und getrocknet, wie dies für Proteine des Typs AB5 üblich ist. Das getrocknete Protein wurde in einem wässrigen Puffer gelöst, der aus PBS mit 0,25 Gew.-% CHAPS bestand, und die erhaltene Lösung sofort in einer Dosis von 2 mg/kg verabreicht.

[008] Die meisten der entgifteten Proteine bewahrten ihre Fähigkeit, Diarrhö bei Mäusen hervorzurufen. Die als CvT-5, CvT-23 und CvT-28 bezeichneten CvT-Mutanten zeigten im Vergleich zum natürlich vorkommenden CvT Protein keine Toxizität, besaßen aber eine starke Wirkung als Mittel zum Hervorrufen von Diarrhö.

[009] Diese mutierten CvT-Proteine wiesen folgende Veränderungen gegenüber nicht mutiertem, natürlich vorkommendem CvT auf:

CvT-Mutant	Mutation
CvT-5	Val-53 zu Asp-53
CvT-23	Ser-97 zu Glu-97
CvT-28	Ser-97 zu Lys-97



Ansprüche:

1. Cholera-vibrio Toxin (CvT) wobei die Aminosäuren an den Positionen Val-53 und/oder Ser-97 in der A-Untereinheit durch eine andere Aminosäure ersetzt werden.
2. CvT gemäß Anspruch 1, wobei Val-53 durch Asp-53 ersetzt wird und/oder wobei Ser-97 durch Glu-97 oder Lys-97 ersetzt wird.
3. Zusammensetzung, die das Protein gemäß Anspruch 1 oder 2 in wässriger Lösung umfasst.
4. Zusammensetzung gemäß Anspruch 3, wobei die wässrige Lösung PBS + 0,25 Gew.-% CHAPS umfasst.

