

**EXAMEN EUROPEEN DE QUALIFICATION 2014**

# **Epreuve A(Ch)**

## **Chimie**

Cette épreuve contient:

- |   |                     |                     |
|---|---------------------|---------------------|
| * | Lettre du demandeur | 2014/A(Ch)/FR/1-8   |
| * | Document D1         | 2014/A(Ch)/FR/9-10  |
| * | Document D2         | 2014/A(Ch)/FR/11-13 |



**LETTRE DU MANDATAIRE**

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

Cher mandataire,

**[001]** Notre petite entreprise de biotechnologie produit des compositions protéiniques. Dans ce contexte, nous avons réalisé une invention importante à laquelle nous tenons beaucoup. Nous vous saurions gré de déposer, dans les plus brefs délais, une demande de brevet pour l'objet de notre invention. Veuillez noter que nous avons pour politique de ne pas payer de taxes de revendication.

**[002]** Vous trouverez en annexe une description de notre invention et deux documents de l'art antérieur qui semblent pertinents pour notre invention. Le document D1 divulgue une méthode qui comprend les mêmes étapes que notre méthode. C'est regrettable, car nous voudrions aussi faire protéger cette méthode. Sachant toutefois que la nouveauté est une des conditions à remplir pour obtenir un brevet auprès de l'Office européen des brevets, il paraît peu probable que cette méthode puisse être protégée. Si vous voyez un moyen d'y parvenir malgré tout, nous vous en serions reconnaissants. Le document D2 divulgue des compositions comprenant les mêmes protéines que celles décrites dans la présente invention.

**[003]** Nous avons développé un procédé visant à détecter des solutions dans lesquelles les protéines conservent leur structure naturelle (solutions stabilisantes). Si possible, nous voudrions aussi faire protéger les solutions stabilisantes détectées par ce procédé.



**[004]** Le choléra est une maladie contagieuse très largement distribuée à travers le monde. Le principal symptôme du choléra est la diarrhée, qui cause une déshydratation et une perte d'électrolytes graves. Le taux de mortalité est de 50 à 60 % en l'absence de traitement.

**[005]** Le choléra est causé par des bactéries qui libèrent des protéines dans le tractus intestinal humain. Ces protéines appartiennent à la famille des protéines diarrhéiques bactériennes (PDB). Cette famille de protéines comprend trois types de protéines, chacun contenant respectivement une sous-unité protéinique Alpha (A) ainsi que deux, quatre ou cinq sous-unités Bêta (B). Ces trois types de protéines PDB sont donc appelés AB2, AB4 and AB5. EcT (Toxine - E. coli ) et CvT (Toxine - Cholérique vibrio) sont des protéines AB5 typiques.

**[006]** On reconnaît généralement que les protéines de type AB5 sont la cause du choléra, mais leur mécanisme d'action n'est toujours pas élucidé. Les recherches dans ce domaine sont ardues, car les protéines de type AB5 sont très instables et deviennent rapidement non fonctionnelles. "Non fonctionnel" signifie ici que le complexe protéinique constitué d'une sous-unité A et de cinq sous-unités B se désagrège, perdant par là la structure tridimensionnelle qu'il possède à l'état naturel. Une fois désagrégée, la protéine de type AB5 ne produit plus ses effets biologiques naturels et ne peut plus être utilisée pour des analyses biochimiques. C'est pour cette raison que les protéines de type AB5 sont habituellement stockées sous forme séchée. Lors de l'utilisation, la protéine est dissoute dans une solution saline standard conservée à 4 °C, puis utilisée rapidement.

**[007]** La solution saline standard utilisée actuellement a donc besoin d'être remplacée par une solution stabilisante dans laquelle la protéine de type AB5 garde longtemps sa structure protéinique complexe.



**[008]** Nous avons développé une méthode pour déterminer la proportion de protéine de type AB5 complexée dans un échantillon. Pour ce faire, l'échantillon d'une protéine PDB de type AB5 est soumis à une chromatographie sur colonne en utilisant, comme matériel de support, un polyméthacrylate hydroxylé (HyPM) ayant des groupes carboxyles libres.

**[009]** Dans nos expériences, nous avons utilisé la colonne Ultrahydrogel-250 (Waters Ltd) comme colonne de Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (CLHP). L'Ultrahydrogel-250 a une taille particulière de 6  $\mu\text{m}$  et une porosité de 250 nm.

**[010]** Pour séparer, sur le matériel de support susdit, les protéines de type AB5 complexées et les protéines de type AB5 désagrégées, la solution tampon suivante : Tris-HCl 200 mM +  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  100 mM, pH = 7,2 doit être utilisée pour éluer les protéines. Une résolution acceptable est encore possible si le pH de cette solution tampon varie de 6,8 à 7,6. Des résultats significatifs n'ont pas pu être obtenus en dehors de ces limites.

**[011]** Les protéines ont été détectées via chromatographie par spectroscopie d'absorption UV, comme c'est habituellement le cas dans l'art antérieur. Deux pics seulement étaient visibles, l'un correspondant à l'unité B5 et l'autre à AB5 complexée. Nous avons donc pu détecter et quantifier la protéine de type AB5 tant à l'état complexé qu'à l'état désagrégé.

**[012]** La stabilité de la protéine de type AB5 peut s'exprimer par un facteur de stabilité (FS). Le FS s'obtient en divisant la quantité de protéine de type AB5 complexée par le total AB5 + B5 (en %). La protéine de type AB5 est dite stabilisée si le FS est supérieur à 70 %, de préférence supérieur à 80 %, et mieux encore supérieur à 90 %.



**[013]** La méthode de séparation décrite ci-dessous permet, pour la toute première fois, de mesurer quantitativement la stabilité du complexe protéinique d'une protéine de type AB5. Grâce à cette méthode, nous avons mis au point un procédé pour trouver des solutions stabilisantes qui améliorent la stabilité des protéines de type AB5 comparée à la solution saline standard utilisée actuellement.

**[014]** Par "solution stabilisante", il faut entendre ici une solution aqueuse qui contient un ou plusieurs agents stabilisateurs contribuant à maintenir la protéine de type AB5 dans sa forme complexée et donc biologiquement active.

**[015]** Le criblage en vue de trouver des agents stabilisateurs est une pratique courante pour l'homme du métier dans le domaine de la formulation des protéines. L'agent stabilisateur candidat peut par exemple être choisi parmi les sucres, les détergents ou les acides aminés. La méthode doit comprendre les étapes consistant à incuber la protéine de type AB5 dans une solution test stabilisante, et à mesurer la stabilité de la protéine de type AB5 comme décrit ci-dessus.

**[016]** L'incubation de l'échantillon peut durer des heures, des jours, des semaines ou même des mois. L'incubation peut avoir lieu à température basse (par exemple 4 °C) ou ambiante (entre 20 °C et 25 °C). Pendant l'incubation, l'échantillon peut rester au repos ou être agité. L'agitation peut servir à accélérer la désagrégation du complexe, et donc à raccourcir le temps d'incubation.

**[017]** Une protéine de type AB5 dans une solution stabilisante peut ensuite être testée quant à son activité biologique. Il existe pour ce faire plusieurs tests in vivo ou in vitro bien connus de l'homme du métier et décrits, par exemple, dans Yamaha (1992) J. Prot. Technol..



## Exemples

**Exemple 1 : séparation par chromatographie des protéines AB5 et B5 de CvT**

**[018]** Dans cette expérience, la protéine CvT obtenue dans le commerce sous forme séchée a été dissoute dans la solution saline standard et incubée dans les conditions indiquées au tableau 1. L'échantillon a ensuite été chargé dans la colonne à CLHP Ultrahydrogel-250 décrite ci-dessus, et la protéine a été éluée au moyen de la solution tampon suivante : Tris-HCl 200 mM + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,0. Des pics de protéines ont été détectés, quantifiés, et le facteur de stabilité (FS) a été calculé.

Tableau 1

Conditions d'incubation	Facteur de stabilité (%) à la température d'incubation	
	4 °C	22 °C
1 heure, au repos	75	56
12 heures, au repos	61	33
24 heures, au repos	45	23
48 heures, au repos	37	18

**[019]** Les données du tableau 1 montrent que la protéine se désagrège rapidement lorsqu'elle est dissoute dans la solution saline standard. Le stockage à température ambiante aggrave considérablement le problème.



**Exemple 2 : criblage en vue de trouver des solutions stabilisantes pour une protéine de type AB5**

[020] Des solutions ont été testées pour leur effet stabilisateur sur un complexe protéinique de type AB5. Nous avons utilisé CvT comme protéine de type AB5. CvT a été utilisée à raison de 0,8 à 2,0 mg/ml. La CvT a été incubée à 4 °C pendant 12 heures dans différentes solutions stabilisantes candidates, dans les conditions indiquées au tableau 2. Après incubation, les échantillons ont été analysés par la méthode de l'exemple 1. Les solutions stabilisantes candidates testées proviennent d'un "Protein-Stabilisation-Test Kit" disponible dans le commerce.

**Tableau 2**

Solution stabilisante candidate		Facteur de stabilité	
		au repos	sous agitation
1	PBS	55	45
2	PBS, galactose 0,1 mM	61	55
3	PBS, 0,25 % en poids CHAPS	95	89
4	Tampon phosphate, pH 7,4	65	54
5	Tampon phosphate, pH 7,4, galactose 0,2 M	64	52
6	Tampon phosphate, pH 7,4, L-arginine 0,4 M	88	82
7	Tampon acétate, pH 5,5, NaCl 300 mM	62	43
8	Tampon acide citrique, pH 6,5	65	38
9	Tampon Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA	59	41
10	Tampon Tris, pH 7,5, L-arginine 0,4 M	59	39
11	Contrôle : solution saline standard	61	42

[021] Les données du tableau 2 montrent que deux solutions (n° 3 et n° 6) sont particulièrement efficaces pour stabiliser la CvT. Ces solutions stabilisantes ont été retenues pour de plus amples analyses.



**Exemple 3 : effet de la L-arginine et du CHAPS sur la stabilité de la CvT**

[022] L'effet stabilisant des solutions stabilisantes n° 3 et 6 a été observé sur un certain laps de temps (1, 2, 10, 30, 60 et 90 jours), au repos. La CvT a été maintenue à une concentration protéinique de 2,0 mg/ml et à une température de 2 à 8°C dans la solution stabilisante. La stabilité du complexe protéinique a été observée par la méthode de l'exemple 1 et le facteur de stabilité a été calculé.

**Tableau 3**

Solutions stabilisantes	Temps d'incubation (jours)					
	1	2	10	30	60	90
Tampon phosphate, pH 7,4 + 50 mM L-arginine	86,5	87,5	88,8	87,0	85,5	84,0
Tampon phosphate, pH 7,4 + 100 mM L-arginine	88,8	87,2	85,6	90,5	83,4	82,2
Tampon phosphate, pH 7,4 + 200 mM L-arginine	86,3	88,3	83,7	83,5	81,2	82,4
Tampon phosphate, pH 7,4 + 400 mM L-arginine	85,8	88,8	88,3	87,2	85,3	83,9
PBS + 0,05 % en poids CHAPS	85,5	87,5	86,8	87,0	86,5	85,0
PBS + 0,15 % en poids CHAPS	90,8	89,2	88,6	88,5	88,4	88,2
PBS + 0,25 % en poids CHAPS	93,3	91,3	90,7	90,5	90,2	89,4
PBS + 0,35 % en poids CHAPS	90,7	88,8	88,3	87,2	90,3	87,9



**[023]** Les données du tableau 3 montrent que le CHAPS et la L-arginine, dans leurs solutions tamponnées respectives, stabilisent les protéines de type AB5, exemplifiées ici par la CvT, pendant une période pouvant aller jusqu'à 90 jours. Cet effet stabilisateur est observé dans un large intervalle de pH (données non indiquées). Accroître la quantité de L-arginine au-delà de 50 mM n'améliore pas la stabilité du complexe protéinique. On obtient une stabilisation satisfaisante en utilisant la L-arginine à raison d'au moins 10 mM. Le complexe protéinique est stabilisé si au moins 0,05 % en poids de CHAPS est présent. De meilleurs résultats ont toutefois été obtenus avec au moins 0,15 % en poids de CHAPS.

Sincères salutations,

Peter St. John



## Document D1

### **Isolement de la protéine homo-duplex VIP2 de S. Echinaceae**

#### Généralités

**[001]** La protéine VIP2 (Very Important Protein) active est constituée de deux sous-unités VIP identiques qui forment la VIP2 biologiquement active. Cette protéine est un composant important dans la voie de communication cellulaire chez S. Echinaceae.

**[002]** Peters et al. (1998) ont fourni un protocole optimisé de la purification de VIP2 à partir d'extraits cellulaires de S. Echinaceae. Ce protocole de purification des protéines ne donnait cependant pas satisfaction, le niveau de pureté atteignable étant insuffisant (env. 94 %).

**[003]** Nous nous sommes donné comme objectif d'améliorer cette situation. À partir de l'extrait protéinique obtenu via la méthode de Peters et al. (1998), nous avons procédé à une analyse approfondie de plusieurs possibilités pour éliminer les contaminants résiduels de l'échantillon contenant de la VIP2. Nous présentons maintenant un procédé simple qui élargit la stratégie de Peters et al. (1998) pour enrichir la VIP2 jusqu'à des niveaux de pureté d'au moins 99 %.

#### Matériaux et méthodes

**[004]** Comme matière première, nous avons utilisé un échantillon contenant de la VIP2 préparé selon la méthode décrite par Peters et al. (1998).



**[005]** Des expériences préliminaires ont permis de tester plusieurs colonnes de Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (CLHP) disponibles sur le marché. Une avancée a fini par être obtenue avec, comme matériel de support, un polyméthacrylate hydroxylé (HyPM) ayant des groupes carboxyles libres (Ultrahydrogel-250, de la société Waters Ltd.).

#### Chromatographie CLHP sur colonne

**[006]** Tampon : Tris-HCl 200 mM + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,2 ; flux : 0,5 ml/min ;  
détection : spectroscopie d'absorption UV ; colonne : Ultrahydrogel 250 (Waters Ltd.);  
matériel de support : polyméthacrylate hydroxylé (HyPM) ayant des groupes carboxyles libres ; taille particulaire : 6 µm ; porosité : 250 nm.

**[007]** Le chromatogramme des protéines éluées au moyen de cette méthode comporte un pic unique correspondant au dimère de la protéine VIP2. Une série de contaminants de faible poids moléculaire nettement séparés de la VIP2 ont aussi été détectés. L'identité de la VIP2 a été confirmée par spectrométrie de masse.

#### Conclusion

**[008]** Nous rapportons pour la première fois un protocole de purification de VIP2 qui permet d'améliorer considérablement le niveau de pureté des protéines VIP2 comparé au protocole de référence publié par Peters et al. en 1998. Un niveau de pureté de plus de 99 % étant atteint, le temps semble venu d'étudier dans les détails la biologie et la biochimie de cette protéine clé dans la communication cellulaire chez *S. Echinaceae*.



## Document D2

### **Mutants détoxifiés de la toxine du choléra (CvT)**

**[001]** Le choléra est une maladie contagieuse très largement distribuée à travers le monde. Elle est causée par des microbes tels que Cholera vibrio (C. vibrio). Le principal symptôme est une diarrhée grave entraînant une déshydratation et une perte d'électrolytes potentiellement mortelles. Des recherches supplémentaires sur la maladie sont nécessaires, même si l'on peut efficacement la traiter par une réhydratation massive et contrôlée.

**[002]** C. vibrio déclenche une diarrhée via la sécrétion de la Toxine Cholérique vibrio (CvT). CvT appartient à la famille des protéines diarrhéiques bactériennes (PDB) qui comprend trois types de protéines, chacun contenant une sous-unité protéinique Alpha (A) et deux, quatre ou cinq sous-unités Bêta (B). C'est pourquoi les trois types de protéines sont appelés AB2, AB4 et AB5.

**[003]** L'utilisation de protéines de type AB5 dans les modèles animaux tels que la souris, le rat et le lapin s'est révélée difficile, en raison de la toxicité inhérente de ces protéines. Pour surmonter ce problème, les protéines de type AB5 ont été modifiées chimiquement à l'aide d'agents de réticulation afin de réduire leur degré de toxicité sans supprimer leur effet diarrhéique.

**[004]** La présente invention propose une solution alternative à ce problème. Nous avons constaté qu'il est possible de détoxifier la CvT par mutation dans la sous-unité A, d'au moins un des acides aminés suivants : Val-53 or Sér-97, tout en maintenant son activité diarrhéique.



**[005]** Le terme "détoxifié" signifie ici que la protéine de type AB5 a une toxicité nettement moins élevée que la protéine à l'état naturel. Idéalement, le degré de toxicité doit être inférieur à 0,01 % de celui de la protéine naturelle.

**Exemple : CvT détoxifiée**

**[006]** Le gène de la CvT a été cloné et des mutants ont été créés par les méthodes standards. Les protéines de type naturel et les protéines mutantes ont été produites, et leur toxicité a été évaluée au moyen du procédé décrit par Jensen et al. dans ToxProt. (1995).

**[007]** Des protéines à toxicité minimale ou nulle ont ensuite été testées quant à leur capacité à provoquer la diarrhée chez la souris. À cette fin, les protéines ont été purifiées, précipitées et séchées comme il est habituel de le faire avec les protéines de type AB5. La protéine sèche a été dissoute dans une solution tampon aqueuse consistant en PBS contenant 0,25 % en poids de CHAPS et la solution obtenue a été immédiatement administrée à raison de 2 mg/kg.

**[008]** La plupart des protéines détoxifiées retiennent leur capacité à provoquer la diarrhée chez la souris. Les CvT mutantes appelées CvT-5, CvT-23 et CvT-28 s'avèrent sans toxicité en comparaison avec la protéine CvT de type naturel, mais elles sont très actives en tant qu'agent diarrhéique.

**[009]** Ces protéines CvT mutantes présentent les mutations suivantes par rapport à la CvT non mutante de type naturel :

CvT mutante	Mutation
CvT-5	Val-53 en Asp-53
CvT-23	Sér-97 en Glu-97
CvT-28	Sér-97 en Lys-97



**Revendications :**

1. Toxine-Cholérique vibrio (CvT) où les acides aminés en position Val-53 et/ou Sér-97 dans la sous-unité A sont remplacés par un autre acide aminé.
  
2. CvT selon la revendication 1, où Val-53 est remplacé par Asp-53 et/ou Sér-97 est remplacé par Glu-97 ou Lys-97.
  
3. Composition comprenant la protéine des revendications 1 ou 2 en solution aqueuse.
  
4. Composition de la revendication 3, où la solution aqueuse comprend PBS + 0,25 % en poids CHAPS.

