

Épreuve d'un candidat

Revendication 1

Procédé de détermination de la proportion de protéine de type AB5 complexée dans un échantillon, comprenant les étapes de :

- a) chromatographie sur colonne, en utilisant comme matériel de support un polyméthacrylate hydroxylé ayant des groupes carboxyles libres et comme solution d'élution une solution tampon de Tris-HCl 200 mM et de Na₂SO₄ à 100 mM, le pH de la solution tampon étant compris entre 6,8 et 7,6, et
- b) détection de la protéine de type AB5 à l'état complexé et à l'état désagrégé.

Revendication 2

Procédé selon la revendication 1, dans lequel le pH de la solution d'élution est 7,2.

Revendication 3

Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel l'étape b est mise en œuvre par spectroscopie d'absorption UV.

Revendication 4

Utilisation d'une colonne de polyméthacrylate hydroxylé ayant des groupes carboxyles libres et d'une solution d'élution tampon Tris-HCl à 200 mM et Na₂SO₄ à 100 mM, le pH de la solution étant compris entre 6,8 et 7,6, pour quantifier une protéine de type AB5 à l'état complexé et à l'état désagrégé.

Revendication 5

Procédé d'identification de solutions stabilisantes d'une protéine de type AB5, dans lequel une solution stabilisante est une solution dans laquelle la protéine conserve sa structure naturelle, comprenant les étapes de :

- a) incubation de la protéine de type AB5 dans une solution test stabilisante, et
- b) mesure de la stabilité de la protéine de type AB5 par un procédé selon la revendication 1.

Revendication 6

Procédé selon la revendication 5, dans lequel l'incubation de l'étape a' est réalisée sous agitation.

Revendication 7

Procédé selon la revendication 5 ou 6, dans lequel la solution stabilisante de protéine de type AB5 identifiée est ensuite testée pour son activité biologique.

Revendication 8

Solution comprenant une protéine de type AB5, du tampon phosphate et de la L-arginine, dans laquelle la L-arginine est présente à raison d'au moins 10 mM.

Revendication 9

Solution selon la revendication 8, comprenant au maximum 50 mM de L-arginine.

Revendication 10

Utilisation d'une solution stabilisante pour améliorer la stabilité d'une protéine de type AB5, dans laquelle la solution stabilisante est choisie parmi :

- une solution comprenant du tampon phosphate et de la L-arginine, la L-arginine étant présente à raison d'au moins 10 mM, et
- une solution comprenant du PBS et du CHAPS, le CHAPS étant présent à raison d'au moins 0,05% en poids.

Revendication 11

Utilisation selon la revendication 10, dans laquelle la solution stabilisante comprend du PBS et du CHAPS, et dans laquelle le CHAPS est présent à raison d'au moins 0,15% en poids.

Revendication 12

Utilisation selon la revendication 11, dans laquelle la solution stabilisante comprend 0,25% en poids de CHAPS.

Revendication 13

Utilisation selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, dans laquelle la solution stabilisante est utilisée pour améliorer la stabilité au stockage à température ambiante de la solution de protéine de type AB5, et dans laquelle la température ambiante désigne une température de 20 à 25°C.

Revendication 14

Utilisation selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, dans laquelle la solution stabilisée de protéine de type AB5 est utilisée pour des analyses biochimiques.

Revendication 15

Utilisation d'une solution selon la revendication 8 pour des analyses biochimiques.

Description

La présente invention concerne la stabilisation des protéines de type AB5. La présente invention concerne un procédé de détermination de la proportion de protéine de type AB5 sous forme complexée dans un échantillon. Elle concerne également un procédé d'identification de solutions stabilisantes d'une protéine de type AB5, une solution de protéine stabilisée particulière, et l'utilisation d'une solution stabilisante pour améliorer la stabilité d'une protéine de type AB5.

[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.

Le document D2 décrit l'utilisation de mutants de la CvT, protéine de type AB5, dans les modèles animaux tels que la souris, le rat et le lapin. Ces mutants ont une toxicité diminuée par rapport à la CvT naturelle, tout en conservant son effet diarrhéique.

Dans D2, la CvT de type naturel et les protéines mutantes ont été administrées chez des souris sous la forme de solutions dans une solution tampon aqueuse consistant en PBS contenant 0,25% en poids de CHAPS. Dans la mesure où la solution a été administrée immédiatement après préparation, sa stabilité n'a pas été étudiée.

Le document D1 décrit un procédé optimisé de purification d'une protéine, la VIP2, qui n'est pas une protéine de type AB5. Ce procédé comprend une étape de CLHP sur une colonne de polyméthacrylate hydroxylé ayant des groupes carboxyles libres, avec une solution d'élution comprenant Tris-HCl à 200 mM et Na₂SO₄ à 100 mM, le pH de la solution étant de 7,2. L'étape de chromatographie est suivie d'une détection de la protéine et des contaminants par spectroscopie d'absorption UV. D1 décrit l'utilisation de ce procédé de séparation uniquement dans le cadre de la protéine VP2.

Le problème technique est de trouver des conditions dans lesquelles une protéine de type AB5 ne se désagrège pas, de préférence en solution stockable.

Dans ce cadre, les présents inventeurs ont mis au point un procédé de détermination de la proportion de protéine de type AB5 dans un échantillon. Ce procédé comprend les étapes listées à la revendication 1. Ce procédé utilise notamment une étape de chromatographie similaire à celle décrite dans D1, mais appliquée à la séparation d'une protéine de type AB5 sous ses formes complexée et désagrégée.

Ce procédé a été mis en œuvre au sein d'un procédé de criblage permettant d'identifier des solutions permettant de stabiliser la protéine de type AB5, dites solutions stabilisantes.

[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

Le procédé d'identification des solutions stabilisantes a permis de mettre en évidence que des solutions comprenant

- soit du PBS et au moins 0,05% en poids de CHAPS,
 - soit du tampon phosphate et au moins 10 mM d'arginine,
- permettent d'obtenir une très bonne stabilisation des solutions de protéine AB5, avec des facteurs de stabilité supérieurs à 80% pour des durées allant jusqu'à 90 jours.

[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 %.*

Un premier objet de l'invention est un procédé de détermination de la proportion de protéine de type AB5 complexée dans un échantillon comprenant les étapes détaillées à la revendication 1.

Le pH optimal de la solution d'éluion est 7,2 ; il fait l'objet de la revendication 2. Une technique de détection des protéines est la spectroscopie d'absorption UV, ce qui fait l'objet de la revendication 3. La revendication 4 vise l'utilisation d'un système colonne + solution d'éluion tel que celui utilisé dans D1, pour quantifier une protéine de type AB5 à l'état complexé et désagrégé.

Un second objet de l'invention est un procédé pour identifier des solutions stabilisantes d'une protéine de type AB5, comprenant les étapes détaillées à la revendication 5.

[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.*

Le fait de réaliser l'incubation sous agitation fait l'objet de la revendication 6.

La solution stabilisante identifiée via ce procédé peut ensuite être testée pour son activité biologique.

Un autre objet de l'invention est une solution comprenant une protéine de type AB5, du tampon phosphate et au moins 10 mM de L-arginine. Dans une telle solution, la protéine de type AB5 est stabilisée. Des facteurs de stabilité supérieurs à 80% ont été obtenus avec une telle solution.

De préférence, la quantité de L-arginine est inférieure ou égale à 50 mM car accroître la quantité d'arginine au-delà n'améliore pas la stabilité du complexe protéinique.

L'invention concerne également l'utilisation d'une solution telle que décrite à la revendication 10 pour améliorer la stabilité d'une protéine de type AB5.

Dans le cas où la solution comprend du PBS et du CHAPS, de meilleurs résultats ont été obtenus avec au moins 0,15% en poids de CHAPS, ce qui fait l'objet de la revendication 11. Les résultats optimums sont obtenus lorsque la solution comprend 0,25% en poids de CHAPS, ce qui fait l'objet de la revendication 12.

Enfin, l'invention vise également l'utilisation telle que décrite ci-avant pour améliorer la stabilité au stockage à température ambiante (20-25°C) d'une solution de protéine de type AB5.

La solution stabilisée de protéine de type AB5 peut finalement être utilisée pour des analyses biochimiques, la solution étant telle que décrite à la revendication 8.

L'utilisation pour stabiliser une protéine de type AB5 telle que décrite ci-dessus peut également comprendre le cas où la solution stabilisée est utilisée pour des analyses biochimiques.

Examination Committee I: Paper A Ch 2014 - Marking details

Category		Maximum possible	Candidate No	
			Marker	Marker
Independent claims	Method for determining the	15	10	10
Independent claims	Method for identifying a	20	15	15
Independent claims	Composition and/or uses	35	26	26
Dependent claims	Dependent claims	15	8	8
Description	Description	15	10	10
Total			69	69

Examination Committee I agrees on 69 marks and proposes the grade PASS