

Prüfungsarbeit eines Bewerbers

Geänderte Ansprüche

1. Verfahren zum Auftrennen einer Probe eines bakteriellen Diarrhö-Proteins (BDP) des Typs AB5 in 2 Fraktionen, wobei
 - die erste Fraktion die Untereinheit B5 und
 - die zweite Fraktion die komplexierte Form AB5 enthältumfassend folgende Schritte:
 - a) Auftragen der Probe auf eine Chromatographiesäule, die als Trägermaterial hydroxyliertes Polymethacrylat mit freien Hydroxylgruppen enthält;
 - b) Elution mit folgendem Puffer:

Tris-HCl 200 mM
Na₂SO₄ 100 mM,

wobei der pH-Wert des Puffers von 6,8 – 7,6 beträgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der pH-Wert des Elutionspuffers 7,2 beträgt.
3. Verfahren zur Messung der Proteinkomplex-Stabilität eines BDP-Proteins des Typs AB5 in einer Probe, umfassend folgende Schritte:
 - a) Chromatographische Auftrennen der Probe gemäß dem Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
 - b) Nachweis der Proteine während der Chromatographie durch Erstellen eines Elutionsprofils,
 - c) Ermittlung und Quantifizierung der Peaks im Elutionsprofil, die B5-Untereinheiten oder komplexiertes AB5 enthalten zur Bestimmung der Menge an B5-Untereinheit und komplexiertem AB5 in der Probe,
 - d) Berechnung des Stabilitätsfaktors (SF) gemäß der folgenden Formel:
$$SF = \frac{\text{Menge an komplexiertem AB5}}{\text{Gesamtmenge AB5 + B5}} \quad (\text{in } \%)$$
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Nachweis in Schritt b) mittels UV-Absorptionsspektroskopie erfolgt.
5. Screeningverfahren zur Ermittlung von Mitteln, die stabilisierend auf ein BDP-Protein des Typs AB5 in einer Probe wirken, umfassend die folgenden Schritte:
 - a) Inkubation einer Probe des BDP-Proteins vom Typ AB5 in wässriger Lösung in Gegenwart des zu untersuchenden Mittels, anschließend

- b) Messung der Proteinkomplexstabilität gemäß dem Verfahren nach Anspruch 3 oder 4,
 - c) Auswahl der Mittel, bei denen der Stabilitätsfaktor über 70 % beträgt.
6. Screeningverfahren nach Anspruch 5, wobei zusätzlich die biologische Aktivität des BDP-Proteins des Typs AB5 nach dem Inkubationsschritt a) getestet wird.
 7. Screeningverfahren nach Anspruch 5 oder 6, wobei die Inkubation bei Raumtemperatur oder unter Kühlung stattfindet.
 8. Screeningverfahren nach einem der Ansprüche 5 - 7, wobei die Probe während der Inkubation unter statischen Bedingungen gehalten oder geschüttelt wird.
 9. Screeningverfahren nach einem der Ansprüche 5 - 8, wobei die Dauer der Inkubation ausgewählt ist aus 1h, 12h, 24h, 48h, 10 Tage, 30 Tage, 60 Tage und 90 Tage.
 10. Screeningverfahren nach einem der Ansprüche 5 – 9, wobei der Stabilitätsfaktor in Schritt c) über 80 % oder über 90 % beträgt.
 11. Zusammensetzung, die ein BDP-Protein des Typs AB5 in wässriger Lösung umfasst, dadurch gekennzeichnet, dass
 - die wässrige Lösung einen Phosphatpuffer und mindestens 10 mM L-Arginin enthält.
 12. Verwendung eines Phosphatpuffers enthaltend mindestens 10 mM L-Arginin zur Stabilisierung eines BDP-Proteinkomplexes des Typs AB5.
 13. Verwendung einer PBS-Lösung enthaltend mindestens 0,05 Gew.% CHAPS zur Stabilisierung eines BDP-Proteinkomplexes des Typs AB5 über einen Zeitraum von mindestens 1 Stunde.
 14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die CHAPS-Konzentration mindestens 0,15 Gew. % beträgt.
 15. Kit-of-parts umfassend mindestens die zwei Komponenten:
 - 1.) ein BDP-Protein des Typs AB5
 - 2.) eine Stabilisierungslösung ausgewählt aus
 - a) einem Phosphatpuffer enthaltend mindestens 10 mM L-Arginin
 - b) einer PBS-Lösung enthaltend
 - mindestens 0,05 Gew.% oder
 - mindestens 0,15 Gew.% CHAPS.

Beschreibungseinleitung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Auftrennen einer Probe eines bakteriellen Diarrhö-Proteins (BDP) des Typs AB5, ein Verfahren zur Messung der Proteinkomplexstabilität eines solchen Proteins sowie ein Screening-Verfahren zur Ermittlung von stabilisierenden Mitteln für derartige Proteine. Ferner betrifft die Erfindung eine Zusammensetzung, die ein BDP-Protein des Typs AB5 in wässriger Lösung enthält, die Verwendung bestimmter Puffer zur Stabilisierung von BDP-Proteinen des Typs AB5 sowie ein Kit-of-parts enthaltend ein BDP-Protein des Typs AB5 als erste Komponente und derartige Stabilisierungsmittel als zweite Komponente.

BDP-Proteine des Typs AB-5 sind die molekulare Ursache der Cholera. Die Erforschung des Wirkmechanismus dieser Proteine ist daher von zentraler Bedeutung für die Suche nach einem Heilmittel. Zurzeit besteht jedoch ein Bedarf an geeigneten Forschungswerkzeugen und Mitteln, die eine Erforschung dieser Klasse von Proteinen erlauben.

[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).*

Chromatographische Aufreinigungsverfahren sind dem Fachmann aus dem StdT gut bekannt. Es steht eine Vielzahl von Verfahren und chromatographischen Trägermaterialien zur Verfügung.

D1 beschreibt beispielsweise ein Aufreinigungsprotokoll für das Protein VIP2.

[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.*

Gemäß D1 lässt sich für VIP2 ein Reinheitsgrad von 99% erreichen, wenn eine Chromatographiesäule verwendet wird, die als Trägermaterial hydroxyliertes Polymethacrylat mit freien Carboxylgruppen und ein Elutionspuffer bestehend aus

Tris HCl 200 mM
NO₂SO₄ 100 mM
pH 7,2

verwendet wird.

Es ist anzumerken, dass VIP2 in keinem bekannten Zusammenhang zu Cholera steht. Außerdem wird gemäß dem Verfahren der D1 der VIP 2 Dimer Proteinkomplex intakt gelassen, im Chromatogramm ist nur ein Proteinpeak ersichtlich. Somit wird in D1 nicht die Auftrennung zweier Proteinpeaks, sondern lediglich die Abtrennung niedermolekularer Verunreinigungen von einem Hauptproteinpeak beschrieben.

Reinigungsmethoden für BDP-Proteine des Typs AB5 sind dem Fachmann bekannt und derartige Proteine sind in getrockneter Form lagerfähig erhältlich.

Wie oben ausgeführt ist es

***[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.*

Eine derartige Verfahrensweise ist auch z.B. in D2 beschrieben, wo Wildtyp CvT sowie mutierte und dadurch entgiftete CvT-Varianten erzeugt, gereinigt und getrocknet werden, um anschließend in einem wässrigen Puffer bestehend aus PBS und 0,25 Gew.% CHAPS gelöst zu werden und sofort der weiteren Verwendung zugeführt werden mussten. Dokument D2 offenbart ferner eine Zusammensetzung, welche Wildtyp oder mutierte CvT-Varianten in wässriger Lösung umfassend PBS und 0,25 Gew.% CHAPS enthält.

Nachteilig an dem StdT auf dem Gebiet der AB5-Erforschung ist, dass keine geeigneten Verfahren zur Messung der Proteinkomplexstabilität eines PDB Proteins des Typs AB5 bekannt sind, die es erlauben würden, bekannte Protein-Stabilisierungstestkits daraufhin zu screenen, ob eine stabilisierende Wirkung auf den AB5-Proteinkomplex eintritt oder nicht.

Es war somit Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereit zu stellen, mit dem die Proteinkomplexstabilität von AB5 gemessen werden kann, was das Screenen und das Bereitstellen von Stabilisierungslösungen ermöglicht.

Diese Aufgabe wird durch das Trennverfahren gemäß Anspruch 1 gelöst, welches durch Verwendung des angegebenen Chromatographiematerials in Kombination mit dem beanspruchten Elutionspuffer erstmals die Auftrennung des AB5-Komplexes von der freien Untereinheit B5 erlaubt und damit eine Messung der Proteinkomplexstabilität gemäß Anspruch 3 erlaubt. Diese wiederum eröffnet die Möglichkeit für ein erfindungsgemäßes Screeningverfahren nach Anspruch 5, welches das Screenen nach geeigneten Stabilisierungsmitteln erlaubt. Dass diese Aufgabe durch die Erfindung gelöst wird, zeigt das Beispiel 2, welches die Identifizierung zweier geeigneter Mittel aus einem Testkit ermöglicht.

Die Erfindung stellt ferner neu identifizierte Stabilisierungsmittel gemäß den Ansprüchen 12 und 13 sowie eine stabilisierte AB5 Proteinzusammensetzung nach Anspruch 11 und ein Kit-of-parts nach Anspruch 15 bereit.

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Die Vorteile der Erfindung zeigen sich am Beispiel 3, wo durch das erfindungsgemäße Screening-Verfahren aufgefundene Lösungen eine Stabilisierung von AB5 von bis zu 90 Tagen erlauben.

Dies hat den Vorteil, dass fertige Lösungen verkauft werden können, und die Forscher nicht immer frisch die AB5 Lösungen ansetzen müssen. Dies sollte auch zur Reproduzierbarkeit von der Forschung beitragen, wenn standardisierte fertige Proteinzusammensetzungen verwendet werden können, die über einen langen Zeitraum stabil bleiben.

- Ende -

Examination Committee I: Paper A Ch 2014 - Marking details

Category		Maximum possible	Candidate No Marks awarded	
			Marker	Marker
Independent claims	Method for determining the	15	13	13
Independent claims	Method for identifying a	20	20	20
Independent claims	Composition and/or uses	35	35	35
Dependent claims	Dependent claims	15	10	10
Description	Description	15	13	13
Total			91	91
Examination Committee I agrees on 91 marks and proposes the grade PASS				