



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년11월17일
(11) 등록번호 10-0927494
(24) 등록일자 2009년11월11일

(51) Int. Cl.
A61L 2/16 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2003-7010430
(22) 출원일자 2002년01월31일
심사청구일자 2007년01월31일
(85) 번역문제출일자 2003년08월07일
(65) 공개번호 10-2003-0077610
(43) 공개일자 2003년10월01일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2002/000092
(87) 국제공개번호 WO 2002/62400
국제공개일자 2002년08월15일
(30) 우선권주장
PR2938 2001년02월07일 오스트레일리아(AU)
(56) 선행기술조사문헌
W0199942829 A1
W0199951279 A1
Journal of Virology(1996) Vol.70(3),
pp1714-1722
Biochemistry(1996) Vol.35, pp 13434-13442

(73) 특허권자
노바팜 리서치(오스트레일리아)퍼티와이리미티드
오스트레일리아, 엔에스더블유 2018, 로즈버리,
프림로즈 애비뉴3-11
(72) 발명자
크리츨러,스티븐
오스트레일리아엔에스더블유2230크로놀라레준애비
뉴9
사바,알렉스
오스트레일리아엔에스더블유2021패딩턴패딩턴스트
리트3/124
잘루나르도,마이클
오스트레일리아엔에스더블유2530쿠나와라윌본크레
센트18에이
(74) 대리인
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 21 항

심사관 : 정재철

(54) 프리온의 소독 방법

(57) 요약

본 발명은 PrP 프리온 (prion) 단백질 또는 그의 대용물로 오염된 표면, 현탁액 또는 용액을 처리하는 방법 및 이를 위한 조성물에 관한 것이다. 이러한 방법 및 조성물은 프리온 단백질을 비-감염성 분자량을 갖는 단편들로 절단하는데 효과적인 1종 이상의 효소 및 PrP^{Sc} 프리온 단백질의 구조적 언폴딩 (unfolding)을 촉진시키지만 상기 1종 이상의 효소를 변성시키지 않도록 선택되는 1종 이상의 작용제 (agent)의 조합을 이용한다.

특허청구의 범위

청구항 1

PrP^{Sc} 프리온 단백질 또는 그의 대용물 (surrogate)로 오염된 표면, 현탁액 또는 용액을,

(1) 상기 PrP^{Sc} 프리온 단백질 또는 그의 대용물을 비-감염성 분자량을 갖는 단편들로 절단하는, 세린 프로테이나제, 아스파르트산 프로테이나제, 메탈로프로테이나제, 케라티나제, 콜라게나제, 및 단백질분해 활성을 보유하는 효소로부터 선택되는 1종 이상의 효소;

(2) 상기 PrP^{Sc} 프리온 단백질 또는 그의 대용물의 구조적 언폴딩 (unfolding)을 촉진시키지만 상기 1종 이상의 효소를 변성시키지 않는, 음이온성 계면활성제 또는 디메틸설폭시드 (DMSO)로부터 선택되는 1종 이상의 제1 작용제 (agent); 및

(3) 상기 PrP^{Sc} 프리온 단백질 또는 그의 대용물의 절단을 방지하지 않으면서 상기 효소의 폴딩을 촉진시키거나 보호하는, 테릭 164, 양쪽이온성 (zwitterionic) 계면활성제, 보락스 또는 트리톤 X-100으로부터 선택되는 1종 이상의 제2 작용제

의 조합으로 동시에 처리하는 단계를 포함하는 소독 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 절단 이후에 단백질 단편의 90% 이상이 27 kDa 미만의 분자량을 갖는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 절단 이후에 단백질 단편의 90% 이상이 25 kDa 미만의 분자량을 갖는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 절단 이후에 단백질 단편의 90% 이상이 23 kDa 미만의 분자량을 갖는 것인 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 1종 이상의 제1 작용제가 복사선, 전기장, 자기장, 에너지 진동 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 추가로 선택되는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 에너지 진동이 초음파, 전자기적 진동 및 기계적 진동 중 하나 이상인 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 1종 이상의 제1 작용제가 열, pH, 단백질을 변성시키는 경향이 있는 유기 용매 종류, 카오토로픽제 (chaotropic agent), 단백질에 결합하는 경향이 있는 계면활성제, 강한 단백질 변성제인 무기염, S-

S 결합을 절단하는 작용제, 아미노산의 친수성 잔기에 대해 강한 친화성을 갖는 물질, 아미노산의 소수성 잔기에 대해 강한 친화성을 갖는 물질, 표면 흡수를 촉진시키는 물질, 음이온성 계면활성제 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 1종 이상의 제2 작용제가 친핵성 용매, 약한 양성자성 안정화 용매, 비이온성 계면활성제, 이온성 계면활성제, 양쪽이온성 및 양쪽성 (amphoteric) 계면활성제, 완충제, 표면 활성 단독중합체, 공중합체 또는 블록공중합체, 술페이트화 화합물, 데옥시콜레이트, 글리코사미노글리칸 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 13

(1) PrP^{Sc} 프리온 단백질 또는 그의 대용물을 비-감염성 분자량을 갖는 단편들로 절단하는, 세린 프로테이나제, 아스파르트산 프로테이나제, 메탈로프로테이나제, 케라티나제, 콜라게나제, 및 단백질분해 활성을 보유하는 효소로부터 선택되는 1종 이상의 효소;

(2) 상기 PrP^{Sc} 프리온 단백질 또는 그의 대용물의 구조적 언폴딩을 촉진시키지만 상기 1종 이상의 효소를 변형시키지 않는, 음이온성 계면활성제 또는 DMSO로부터 선택되는 1종 이상의 제1 작용제; 및

(3) 상기 PrP^{Sc} 프리온 단백질 또는 그의 대용물의 절단을 방지하지 않으면서 상기 1종 이상의 효소의 폴딩을 촉진시키거나 보호하는, 테릭 164, 양쪽이온성 계면활성제, 보락스 또는 트리톤 X-100으로부터 선택되는 1종 이상의 제2 작용제

를 포함하는, PrP^{Sc} 프리온 단백질 또는 그의 대용물로 오염된 표면을 처리하기 위한 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 1종 이상의 제1 및 제2 작용제가, 절단 이후에 단백질 단편의 90% 이상이 27 kDa 미만의 분자량을 갖도록 선택되는 조성물.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 1종 이상의 제1 및 제2 작용제가, 절단 이후에 단백질 단편의 90% 이상이 25 kDa 미만의 분자량을 갖도록 선택되는 조성물.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 1종 이상의 제1 및 제2 작용제가, 절단 이후에 단백질 단편의 90% 이상이 23 kDa 미만의 분자량을 갖도록 선택되는 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

PrP^{Sc} 프리온 단백질 또는 그의 대용물로 오염된 표면을 제13항에 따른 조성물로 처리하는 것을 포함하는 상기 표면의 처리 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 표면이 의료 또는 수술 기구의 표면인 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 표면이 식품 제제 또는 병원 용품의 표면인 방법.

청구항 22

삭제

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 양쪽이온성 계면활성제가 아미도 베타인 (amido betaine)인 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 음이온성 계면활성제가 알킬벤젠 술포네이트 또는 알킬 술페이트인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 알킬벤젠 술포네이트가 도데실 벤젠 술포네이트 (DOBS)인 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 알킬 술페이트가 소듐 도데실 술페이트 (SDS)인 방법.

청구항 27

제13항에 있어서, 음이온성 계면활성제가 알킬벤젠 술포네이트 또는 알킬 술페이트인 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 알킬벤젠 술포네이트가 DOBS인 조성물.

명 세 서

기술 분야

- <1> 본 발명은 프리온 (prion)을 불활성화하는 방법 및 이를 위한 조성물, 및 프리온 또는 구조적으로 유사한 변형된 단백질에 의해 오염된 물질을 소독하는 수단에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 역사적으로, 박테리아, 진균, 기생충 및 비로이드 (viroid) 등의 감염체에 대해서는 다양한 형태의 소독 및 멸균 (예, 증기 멸균, 건조 멸균, 저온살균, 멸균 여과, 산화에틸렌, 글루타르알데히드, 페놀 또는 다른 소독용 화학물질로의 처리, 복사선 등)을 포함하는 잘 확립된 억제 방법이 존재한다. 또한, 바이러스에 대해서는 예를 들어 pH를 4.0 이하로 낮추는 방법, 60 °C에서 장시간 가열하는 방법 또는 유기 용매를 고농도로 사용하는 방법과 같은 확립된 방법이 존재한다. 이외에도, UV 처리, 포름알데히드 및 특정 항바이러스제가 사용되어 왔다.
- <3> 본 발명 이전의 수년 동안, 종래에는 알려져 있지 않던 새로운 종류의 병원성 물질이 발견되었으며, 과학 문헌들에 보고되었다. 이들은 프리온이라 불리우며, 오늘날 건강 관리 산업이 직면한 가장 큰 과제들 중 하나를 제시한다. 프리온은 박테리아 및 기존에 알려진 다른 감염체와는 구별되는 감염성 입자이다. 프리온의 정확한 구조에 대한 확실한 증거는 없지만, 프리온이 원인인 것으로 보이는 많은 질병들이 최근 인간 및 동물 모두에서 확인되었다. PCT/US00/14353 (이 문헌의 내용은 본원에 참고로 포함됨)에 상술된 바와 같이, 프리온이 원인인 인간 질병으로는 구루 (Kuru), 크루츠펬트-야콥 (Creutzfeldt-Jakob) 병 (CJD), 게르스트만-스트라우슬러-샤인커 (Gerstmann-Straussler-Scheinker) 병 (GSS) 및 치명적 가족 불면증 (Fatal Familial Insomnia) (FFI)을 들 수 있다.
- <4> 인간의 프리온 질병 이외에도, 동물의 질환이 알려진 프리온 질병군에 포함된다. 양 및 염소의 스크래피 (scrapie)가 아마도 가장 잘 연구된 동물의 프리온 질병인 것으로 보인다. 여러 방면의 조사 결과는 변형 CJD와 전술한 전염병인 소해면양뇌증 (BSE) 사이의 관련성을 시사한다. 성공적인 치료 치료법은 아직 개발되지 않고 있으며, 그 결과 이러한 질병들은 항상 치명적이게 마련이다. 잠복 기간이 인간에서 최대 30년일 수 있다는 사실이 상기 문제에 부가되는데, 이러한 요인은 관련 분야의 과학자들에게 주요 과제를 제시하며, 일부는 "진행

중인" 전염병을 예측하게 된다.

- <5> 감염의 위험이 있을 수 있는 군들은 수술 동안 감염된 의료 기구와 접촉할 수 있는 환자, 감염된 물질을 절개하는 의료 스태프, 및 기구를 세정 및 멸균하는 건강관리 종사자를 포함한다. 또한, 위험이 있는 군들을 확대하여 의사, 도살업자, 주로 유럽에서 젖소 또는 육우와 접촉하는 정육업자, 및 보다 최근에는 수혈받거나 프리온 질병이 잠복하는 공여자의 기관을 받은 사람이 포함될 수 있도록 하는 것도 관심의 대상이 되고 있다.
- <6> 프리온의 구조는 집중적인 연구 대상이 되어 왔으며, 여러 관점들이 나타났다. 일부 과학자들은 이들이 매우 작은 바이러스라고 믿고 있지만, 대부분의 전문가들은 프리온이 DNA 또는 RNA 코어 없이도 실제로 감염성인 단백질이라고 믿고 있다. 현재로서 보다 구체적으로 일치하는 사실은 포유동물의 PrP 유전자가 가용성의 비-질환성 세포 형태의 PrP^C 또는 불용성의 질환성 형태의 PrP^{Sc}일 수 있는 단백질을 발현시킨다는 것이다. 다방면의 증거는 정상적인 세포 형태가 비정상적인 PrP^{Sc} 형태로 전환되는 것으로부터 프리온 질병이 발병하게 됨을 암시한다. 이러한 2가지 형태의 아미노산 서열에서의 검출가능한 차이는 없다. PrP^C 형태는 프로테아제 K에 의해 분해되는 고도로 막 결합성인 33 내지 35 kDa 크기의 단백질로 구성된다. 그러나, PrP^{Sc} 형태는 변형된 구조적 형태, 특히 높은 수준의 β -쉬트 구조를 갖는다. 감염성의 변형된 구조적 형태를 진단하는데 유용한 PrP^{Sc}의 특성은 27 내지 30 kDa 크기의 프로테아제 내성 코어이다. 구조적으로 변형된 감염성 형태의 특이적인 다른 특징은 그가 소수성 코어를 가지고 있다는 점이다.
- <7> 종래의 소독제 및 멸균제는 허용가능한 시간내에 프리온에 대하여 유의한 효과를 나타내지 않는다. 프리온을 불활성화하고(하거나) 프리온이 전달될 수 있는 표면을 소독하기 위한 시도는 임시적인 내성을 나타내었다. 요구되는 조건은 일반적으로 시간 및 비용의 측면에서 뿐만 아니라 물질에 대한 손상 및 직업상 관련된 건강상의 위험 측면에서도 너무 엄격해서 통상의 소독에서는 실시할 수 없는 것이다. 예를 들어, 한 연구에서 감염성 PrP^{Sc} 입자가 600 °C에서 5 내지 15분의 건조 가열 후 샘플에서 검출되었지만, 전체 파괴는 1,000 °C에서 15분 후, 200 °C 초과 온도에서는 1 내지 10시간 후에 달성될 수 있었다. 1 M 가성 소다 (pH 14)로 2시간 동안 처리하는 것이 제안되었지만 이러한 처리는 매우 부식성이어서 스테프에게는 위험하며 물질에 대해서도 자극적이다. US5633349는 6 내지 8몰의 요소 또는 1 내지 2몰의 소듐 티오시아네이트로 최소 12시간 (바람직하게는 18시간) 동안 처리하는 것을 포함하는, 생물학적 물질의 처리 방법을 기술하며, 이 방법은 상기 언급한 것과 유사한 단점을 갖는다.
- <8> 오염제거에서의 어려움으로 인해, 뇌 수술에 사용되는 수술 기구는 1회만 사용하는 것이 바람직한 것으로 제안되었는데, 이는 과도한 비용 및 몇몇 기구의 경우 비실용성 이외에도 폐기상의 위험을 암시한다. PCT/US00/14353은 다가양이온 덴드리머 (dendrimer)를 사용하여 프리온을 비감염성으로 만드는 방법을 기술하지만, 이 방법이 표면 소독에 있어서 가격적인지, 영구한지 또는 상업적으로 가능한 것인지의 여부가 분명하지 않다.
- <9> PrP^C 형태 및 PrP^{Sc} 형태에 대하여 주의가 집중되고 있지만, 이 단백질은 주로 알파 나선 구조의 PrP^C 형태와 주로 β -쉬트 구조의 PrP^{Sc} 형태 사이의 중간 정도의 β -쉬트 함량을 가지며 변성제의 부재하에 용해도를 나타내는 중간체로 존재할 수 있다는 것이 또한 제안되었다.
- <10> 정상적인 가용성 단백질이 구조적으로 변형된 불용성 단백질로 어셈블리 (assembly) 또는 미스어셈블리 (misassembly)되는 것은 다양한 다른 질병으로 인해 발생하거나 이러한 질병과 관련되는 것으로 생각된다. 본 발명은 본원에서 프리온과 관련해서 기술되어 있지만, 이 질병과 관련된 다른 불용성 또는 구조적으로 변형된 효소 내성 단백질에도 적용될 수 있는 것으로 이해된다.
- <11> 상기 논의된 선행 기술은 오스트레일리아에서 통상의 일반적인 지식에 대하여 인정되는 것으로 해석되지 않는다.
- <12> 본 발명의 목적은 프리온으로 감염된 표면을 소독하는 향상된 수단, 또는 적어도 대안적인 수단을 제공하는 것이다. 어떤 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 프리온을 선행 기술의 방법보다 더 효과적으로, 즉 주어진 시간 내에 더 효과적으로, 또는 더 짧은 시간내에 효과적으로 불활성으로 만든다. 본 발명의 매우 바람직한 여러 실시양태는 60 °C 미만의 온도에서 60분보다 적은 시간 이내에 4 로그를 초과하는 감소를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 프리온에 대해 표면 이외의 위치에서, 예를 들어 현탁액 중에, 고체, 액체 또는 기체상 매질 또는 생물학적 시스템 중에 적용할 수도 있으며 다른 시험관내 또는 생체내 용도를 가질 수도 있다. 본 발명의

몇몇 실시양태의 목적은 개선된 진단 수단을 제공하는 것이며 다른 실시양태의 목적은 항체 제조를 위한 신규 에피머(epimer)를 제공하는 것이다.

- <13> 본원에 사용된 용어 "프리온 단백질"은 전장 프리온 단백질 서열과 실질적으로 동일한 다른 상호작용 또는 활성을 갖는 변이체, 단편, 융합체 및 동족체를 포함하지만, 모든 형태의 2차 구조들을 이용하는 것이 보다 편리할 수 있으며 이들을 포함한다. 또한, 이 용어는 본원에서 프리온 대용물(surrogate), 즉 프리온 그 자체는 아니지만 프리온과 유사한 구조를 갖거나 유사한 거동을 나타내며, 특정 조건하에서 프리온이 어떻게 작용하는지를 모델링하거나 예상하는데 사용될 수 있는 단백질을 포함하는 것으로 사용된다. 용어 "PrP^{Sc} 프리온 단백질"은 유사하게 넓은 의미를 갖는 것으로 의도되지만, 이들의 2차 또는 3차 구조에 의해 효소 내성이 있는 프리온 단백질로 한정되며, 마찬가지로 효소 내성인 구조를 포함한다.

발명의 상세한 설명

- <14> 제1 측면에 따라 본 발명은 PrP^{Sc} 프리온 단백질 또는 그의 대용물로 오염된 표면을, (1) 프리온 단백질을 비-감염성 분자량을 갖는 단편들로 절단하는데 효과적인 1종 이상의 효소 및 (2) PrP^{Sc} 프리온 단백질의 구조적 언폴딩(unfolding)을 촉진시키지만 상기 1종 이상의 효소를 변성시키지 않도록 선택되는 1종 이상의 작용제(agent)의 조합으로 동시에 처리하는 단계를 포함하는 소독 방법을 제공한다.
- <15> 제2 측면에 따라 본 발명은 프리온 단백질의 절단을 방지하지 않으면서 (3) 상기 1종 이상의 효소의 폴딩(folding)을 촉진시키거나 보호하도록 선택되는 1종 이상의 작용제를 추가로 포함하는 제1 측면에 따른 방법을 제공한다. 바람직하게는, 조건은 리폴딩에 비해 언폴딩을 촉진시키도록 선택된다.
- <16> 현재, 27 kDa 미만의 분자량을 갖는 단백질은 비감염성이어서 안전한 것으로 허용되며, 따라서 본 발명의 방법은 프리온을 90% 이상, 바람직하게는 98% 이상이 27 kDa 미만, 바람직하게는 25 kDa 미만, 보다 바람직하게는 23 kDa 미만인 단편들로 분해 또는 절단하는 것을 포함한다. 그러나, 향후에 27 kDa 미만의 단백질이 감염성인 것으로 밝혀진다면, 본 발명의 방법은 상기 단백질을 임의의 안전한 크기의 단편들로 절단하는데 이용될 수 있을 것이다.
- 본원에 사용된 용어 "프리온 대용물"은 FDA 정의에 따른 것이며, 즉 β -폴딩의 존재로 인해 프로테아제에 대해 유사한 내성을 갖는 단백질을 말한다.
- <17> 본원에 사용된 용어 "작용제"는 화학 시약, 예를 들어 음이온성 계면활성제, pH 조절 시약과, 상황에 따라 폴딩 또는 언폴딩을 촉진시키는 압력, 온도, 복사선 및 다른 에너지 영향 등의 물리적 및(또는) 열역학적 조건에 영향을 주는 비-화학 작용제를 둘 다 포함한다. 폴딩 작용제는 흔히 "리폴딩(refolding)" 작용제라고 부른다. 언폴딩 작용제는 흔히 "변성" 작용제라고 부른다.
- <18> 제3 측면에서 본 발명은 구조적 언폴딩을 촉진시키도록 선택되는 상기 1종 이상의 작용제가 복사선, 전기장, 자기장, 에너지 진동 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 작용제를 포함하는, 상기 제1 또는 제2 측면에 따른 방법을 제공한다.
- <19> 본 발명의 매우 바람직한 실시양태에서, 화학적 작용제 및 물리적 작용제의 조합이 사용되며, 예를 들어 단계 (2)의 작용제는 음이온성 계면활성제를 초음파에 의한 초음파분해처리와의 조합으로 포함한다.
- <20> 바람직한 경우 프리온을 처리 동안 초음파 범위의 음파로 처리한다. 그러나, 언폴딩은 다른 형태의 복사선, 예를 들어 마이크로파 복사, 무선주파수의 복사, 적외선, 가시광선 또는 U.V. 스펙트럼, 청취가능하거나 낮은 주파수의 음성, 자석 또는 보어텍스(vortex) 교반 등의 기계적 수단으로부터의 에너지 진동에 의해 유도되거나 보조될 수 있다. 다른 형태의 에너지 유입은 전자빔 복사, 레이저 복사 또는 전기분해로부터의 에너지 유입을 포함할 수 있다.
- <21> 다른 측면에 따라, 본 발명은 상기 방법을 수행하는데 사용되는 조성물, 이 방법에 의해 제조되는 신규 프리온 단편 및 이러한 단편으로부터 제조되는 신규 항체를 포함하는 것에 이르기까지 확장된다.
- <22> 본 발명에 따라, 오염된 표면, 예를 들어 PrP^{Sc} 단백질로 오염된 수술 기구를, (1) 프리온 단백질을 비감염성 분자량(현재, 27 kDa 미만)의 단편들로 절단하는데 효과적인 1종 이상의 효소 및 (2) 프리온 단백질의 구조적 언폴딩을 촉진시키도록 선택되는 1종 이상의 작용제의 조합으로 처리한다.

- <23> PrP^{Sc} 단백질은 단백질분해 효소를 포함하는 효소에 의한 공격에 대해 특징적으로 내성을 나타낸다. 이론에 얽매하고자 하는 것은 아니지만, 본 발명자들은 효소의 공격에 대한 PrP^{Sc} 단백질의 내성이 폴딩된 구조 (알파 나선 구조에 비해 높은 비율의 β-쉬트 2차 구조를 가짐)의 결과인 것으로 추측하였다. 본 발명은 선택된 조건 하에서 PrP^{Sc} 단백질의 언폴딩을 충분하게 촉진시키는 1종 이상의 작용제를 선택하여 효소가 PrP^{Sc} 단백질에 접근하여 그를 절단하게끔 할 수 있다는 생각을 포함한다.
- <24> 많은 단백질들은 그들 고유의 3차원 폴딩 패턴 ("2차 및 3차 구조")을 상실하여 "변성"되기 쉽다. 변성은 분자 내 상호작용, 특히 수소 및 디설피드 결합의 파괴, 및 이에 따라 실제로 모든 천연 단백질이 분자의 적어도 일부에서 갖고 있으며, 일반적으로 해당 단백질의 활성에 결정적인 작용을 하는 2차 구조의 상실을 포함한다.
- <25> 당업자라면 효소가 그 자체로 단백질이며 단백질의 언폴딩을 촉진시키는 작용제에 의해 쉽게 변성되는 경향이 있음을 알 것이다. 이것이 언폴딩 작용제가 효소에 결합하여 효소가 표적 기질에 결합하는 것을 방지하기 때문인지 또는 보다 가능하게는 언폴딩 작용제가 효소의 구조적 형태의 언폴딩을 촉진시켜 그를 불활성 또는 "변성된" 상태로 만들거나 이러한 작용을 함께 나타내기 때문인지는 명확하지 않다. 한편 PrP^{Sc} 단백질은 언폴딩에 대하여 고도로 내성이 있다. 본 발명의 이전까지는 PrP^{Sc}와 같이 처리하기 어려운 단백질에 영향을 주는데 효과적인 언폴딩 작용제의 존재하에 효소가 활성을 보유하는 시스템을 조직하기가 불가능한 것으로 생각되었다. 놀랍게도 본 발명자들은 (i) 특정 언폴딩 작용제가 PrP^{Sc} 단백질을 선별적으로 언폴딩시키거나 릴랙스 (relax)하지만 선택된 효소를 언폴딩 (변성)시키지 않는다는 것과, (ii) 폴딩 작용제가 효소 활성을 선별적으로 촉진시키거나 보유하지만 언폴딩 작용제는 프리온을 선별적으로 또는 충분히 언폴딩시킴으로써 효소가 접근하여 프리온을 절단할 수 있도록 하는 방식으로 폴딩 및 언폴딩 작용제를 조합할 수 있다는 것을 알아내었다.
- <26> 본 발명에서 본질적으로 상반되는 상기 사항들은 작용제를 "폴딩" 또는 "언폴딩"을 촉진시키는 것들로 분류하고 나서 이들 작용제가 효소 및 PrP^{Sc} 단백질 또는 그의 대용물에 대하여 나타내는 상대적인 효과를 결정함으로써 충족되었다.
- <27> 표면을 먼저 1종 이상의 작용제로 처리하고 나서 이후에 1종 이상의 효소를 첨가할 수 있지만, 바람직한 실시양태에서는 이들을 동시에 수행하여 표면을 처리한다.
- <28> 효소는 단백질분해 효소인 것이 바람직하다. 적합한 효소로는 다음과 같은 것들이 있다:
- <29> - 비특이적 프로테이나제: 예, 세린-, 아스파르트-, 메탈로-프로테이나제
- <30> - 보다 특이적인 프로테이나제: 예, 케라티나제, 콜라게나제 등
- <31> - 단백질분해 활성을 보유하는 임의의 다른 효소(들)
- <32> 프리온 단백질의 구조적 언폴딩을 촉진시키도록 선택되는 1종 이상의 작용제는 효소가 프리온 단백질에 접근하는데 효과적인 것들이 선택된다.
- <33> 일반적으로 폴리펩티드 쇄의 폴딩-언폴딩은 열역학적으로 가역성 평형 과정이거나 비가역적 과정일 수 있다.
- <34> 단지 예로서, 언폴딩 (변성)을 촉진하는 작용제에는 하기가 포함된다.
- <35> (1) 열 - 약 150 °C 이하의 온도 증가.
- <36> (2) pH - 3 미만 및 9 초과 값 (용매에 접근하기 쉬운 많은 측쇄 잔기의 이온화에 의한 전체 효과) 또는 몇몇 분자에서는 특정 기의 이온화에 의한 (예를 들어, 세린 프로테아제에서는 카르복실레이트의 N-말단 아미노기의 이온화에 의한 것일 수 있음) 국소 효과에 기여할 수 있다.
- <37> (3) 단백질을 변성, 용해 또는 팽창시키려는 경향이 있는 선택된 유기 용매의 종류. 일반적으로 생성물은 완전히 언폴딩되지 않고 천연의 상태와 다른 정렬된 구조를 갖는다. 나선형 구조 (즉, 언폴딩)를 촉진시키는 용매의 예로는 N-디메틸포름아미드, 포름아미드, m-크레졸, 디옥산, CHCl₃, 피리딘, 디클로로에틸렌 및 2-클로로에탄올이 있다. 이 군에는 또한 수소 결합을 형성하려는 경향이 적은 용매, 예를 들어 알콜, 에탄올, n-프로판올, 메탄올 (특히 0.01% HCl과의 혼합물)이 포함된다. 또한, 구조를 파괴하는 경향이 있는 용매, 예를 들어 고농도의 디메틸설폭사이드 (DMSO), 디클로로아세트산 및 트리플루오로아세트산 및 다른 친전자성 용매.
- <38> (4) 특정 유기 용질 및 카오트로픽제 (chaotropic agent). 예를 들어, 우레아, 구아니딘 히드로클로라이드

(GuHCl). 예외적으로 안정한 몇몇 단백질을 제외하고는 랜덤하게 코일링된 폴리펩티드로의 전환을 실온에서 6 내지 8 M의 GuHCl로 완료시킨다. 이들 작용제는 온도, pH, 다른 시약 및 조건에 의해 현저하게 영향을 받을 수 있다.

- <39> (5) 특정 계면활성제 - 이온성 계면활성제는 단백질과 결합하여 3차 구조의 언폴딩을 개시하려는 경향이 있다. 음이온성 디터전트 (detergent)는 매우 강한 변성제이다. 예를 들어, 소듐 도데실 술페이트 (SDS)는 임계 미셀 농도 근처의 농도에서 많은 (단, 전부는 아닌) 단백질을 완전히 언폴딩할 수 있다. 도데실 벤젠 술포네이트는 또한 변성제이다. 디터전트의 소수성 부분이 정렬된 구조의 단백질과 상호작용하여 미셀 영역을 형성하는 경우가 있기 때문에 디터전트가 반드시 완전하게 언폴딩시키는 것은 아니다. 양이온성 계면활성제는 통상 음이온성 언폴딩 작용제보다 덜 효과적이다. 도데실 에톡시 술페이트의 소 혈청 알부민 (BSA)을 변성시키려는 경향은 에톡시 기가 증가함에 따라 감소하고 에톡시 기가 6개를 넘으면 사라진다.
- <40> (6) 무기염은 단백질의 형태 변형을 유도할 수 있다. 예를 들어, LiBr, CaCl₂, KSCN, NaI, NaBr, 소듐 아지드가 강한 변성제이다. 이들 염은 단백질을 반드시 완전히 언폴딩하는 것은 아니지만, 남아있는 정렬된 구조를 에너지 유입, 예를 들어 온도 증가에 의해 파괴할 수 있다. $\text{CNS}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{SO}_4^-$ 와 같은 음이온은 구아니디늄염 및 테트라알킬 암모늄염과 유사한 특성을 보인다. 그러나 (GuH)₂SO₄는 특정 단백질을 변성으로부터 보호하는 것으로 알려져있다.
- <41> (7) 티오글리콜과 같은 S-S 결합을 절단하는 작용제.
- <42> (8) 아미노산의 친수성 또는 소수성 잔기와 강한 친화성을 갖는 다른 물질.
- <43> (9) 공기/액체 경계면을 비롯한, 제올라이트를 포함하는 특정 표면 및 경계면에 흡착. 이들로는 예를 들어 미분 알루미늄, 실리카 및 기타 크로마토그래피 및 정지상이 포함되지만 이에 한정되지 않는다.
- <44> (10) 초음파 에너지, 적외선 및 마이크로파 복사, 고압, 및 양성자에 전기장 및(또는) 자기장을 작용시키는 것은 언폴딩 (리폴딩)을 촉진시킬 수 있고, 진탕 또는 교반도 영향이 있을 수 있다.
- <45> 본 발명의 바람직한 형태에서는 작용제를 조합하여 사용하는데, 예를 들어 계면활성제 및(또는) 적합한 용매를 초음파와 함께 사용한다. 초음파와 같은 에너지 유입이 효소를 변성시킬때보다 더 빠른 속도로 PrP^{Sc} 단백질의 언폴딩을 위한 폴딩/언폴딩 평형에 이르게 하는 것을 돕는 것인지, 또는 단지 프리온에 대한 시약 또는 효소의 접근을 제공하는 것을 돕는 것인지, 또는 효소를 활성화하는데 효과적인지는 분명하지 않다. 에너지 적용의 다른 방법에는 아음속 범위의 음파의 적용이 포함된다. 그러나 에너지 진동은 전기기계적 복사의 다른 형태 또는 자석 교반 또는 보어텍스 교반과 같이 기계 장치로부터의 에너지 진동에 의해 유도될 수 있다. 에너지 유입의 다른 형태에는 전자빔 조사, 레이저 또는 전기분해가 포함될 수 있다.
- <46> 상기 나타낸 바와 같이 언급된 대부분의 언폴딩 작용제는 효소 변성에 효과적인 것으로 예상된다. 언폴딩 작용제 및 그의 이용 조건은 효소를 변성시키지 않으면서 PrP^{Sc} 단백질 또는 그의 대용물을 분해하도록 주의깊게 선택하거나, 또는 별법으로 언폴딩 작용제를 폴딩 작용제와 조합하여야 한다.
- <47> 적합한 폴딩 작용제에는 하기가 포함된다:
- <48> (1) 친핵성 용매 및 고도로 수소 결합된 유기 용매. 펩티드 수소 결합의 에너지와 용매 분자간의 수소 결합의 강도 사이에는 경쟁이 있다. 용매 분자가 강한 수소 결합에 의해 연결된 경우, 평형은 펩티드 수소 결합을 안정화시키는 쪽으로 이동한다. 양호한 양성자 수용체이지만 약한 양성자 공여체인 디옥산, 아세토니트릴, 디메틸포름아미드, 피리딘, 및 낮은 농도의 디메틸설폭시드 (DMSO)와 같은 용매는 펩티드 수소 결합을 파괴하려는 경향이 매우 약하고 정렬된 구조, 특히 구형 단백질로 유도하려는 경향이 있다.
- <49> (2) 약한 양성자성이고 구조적으로 안정하게 남아있으려는 경향이 있는 단백질 존재하에 있으며 안정화제로 사용될 수 있는 다가 알콜 (예를 들어, 글리콜, 에틸렌글리콜 및 프로필렌글리콜, 수크로스 등)과 같은 안정화 용매.
- <50> (3) 비-이온성 계면활성제, 예를 들어 알킬, 페닐 또는 알킬 에톡실레이트, 프로폭실레이트 또는 그의 공중합체, 알킬폴리글루코시드 등, 사르코시네이트 (예를 들어, 소듐-(N-라우로일)사르코시네이트)는 단백질의 3차 구조를 변화시키지 않고, 임의의 언폴딩은 비-특이적인 협동적 상호작용에 의해 계면활성제 결합이 상당히 증가되기 시작하는 등온 영역에서 발생한다. SDS의 효과는 비-이온성 또는 양쪽성 계면활성제의 첨가에 의해

감소될 수 있다.

- <51> (4) 양쪽이온성 (zwitterionic) 및 양쪽성 (amphoteric) 계면활성제.
- <52> (5) 고농도의 완충제 (예를 들어, 포스페이트, 아세테이트, 시트레이트, 보레이트)
- <53> (6) 교대로 반복하는 배열에서 약한 소수성 및 약한 친수성 영역을 포함하는 표면 활성 단독중합체, 공중합체 또는 블록중합체.
- <54> (7) 보호제, 예를 들어 술페이트화 화합물, 데옥시콜레이트, 글리코사미노글리칸.
- <55> 폴딩 작용제를 언폴딩 (변성) 작용제와 조합하는 경우, 프리온을 비가역적으로 언폴딩시키거나 또는 적어도 효소에 의한 접근에 대해 충분히 개방시키면서 효소를 보호하거나 리폴딩시킬 수 있도록 작용제 및 조건을 선택해야 한다. 예를 들어, 언폴딩 작용제는 PrP^{Sc} 단백질에 대해 선택적으로 작용하지만 폴딩 작용제는 효소에 대해 선택적으로 작용하도록 pH 및(또는) 온도를 선택할 수 있다.
- <56> **본 발명을 수행하기 위한 최적의 방법**
- <57> 높은 글로불린 함량의 소 알부민 (시그마(Sigma) 제품 A7906), 베타-갈락토시다제 (G7279) 및 토끼 근육 미오신 (M0163)을 용해도가 낮고 베타-쉬이트 함량이 높은 단백질 모델로서 사용하였다. 상기 단백질의 분자량은 프리온의 분자량보다 상당히 크다. 실험에 사용된 대부분의 프로테아제가 프리온과 유사한 분자량 (20 내지 35 kDa)을 갖기 때문에 효소적 분해 후 펩티드 단편의 분자량을 확인하는 것은 쉽다.
- <58> SDS-PAGE는 문헌 [Laemmli U. K., Nature, 227, pages 680-685, (1970)]에 기재된 방법을 사용하여 수행하였다. 단백질 용액을 2% SDS를 함유하는 샘플 완충액에서 2분 동안 비등시켰다. 1.5 mm 폴리아크릴아미드 슬랩 겔 (8-12%)에 레인 당 10 μl 의 단백질을 로딩하고, 비-환원 조건 (즉, 샘플 완충액에 베타-메르캅토에탄올이 존재하지 않음)으로 수행하였다. 전기영동을 150 V에서 1 시간 동안 수행하여, 가장 빨리 이동하는 염료가 겔의 끝부분에 도달하게 하였다. 이어서 겔을 제거하고 단백질 밴드를 콤마시 브릴리언트 블루 (Coomassie brilliant blue) R-250 (시그마) 또는 은 염색 (바이오-라드 (Bio-Rad))으로 염색하여 눈으로 확인하였다. 단백질에 대한 분자량 값은 미리 염색한 저 분자량 마커 (바이오-라드 마커 161-0318)로 얻은 적정 곡선을 사용하여 측정하였다.
- <59> 언폴딩 작용제 및 효소를 조합하여 작용시킨 후 분자량이 14.4 kDa (라이소자임의 분자량)보다 큰 단편이 검출되지 않는 경우 단백질 절단이 충분한 것으로 간주하였다. 이는 상기 처리가 대용물에 대해 효과적임을 나타낸다.
- <60> 분자량이 39.8 kDa보다 큰 펩티드 단편이 존재하는 경우, 결과는 양성으로 기록하였다.
- <61> 본 발명의 방법을 이용하여 프리온을 불활성화시키면서 대용물을 거의 절단하지 않을 수 있다는 것을 입증하기 위해, 프리오닉스 아게 (Prionics AG)에 의해 개발된 프리온 검출 시험을 이용하였다. "프리오닉스-체크 (Prionics-Check)"는 프리오닉스 아게에 의해 개발된 신규 항체를 사용하는 동물 조직에서의 프리온 검출을 위한 면역학적 시험이다. 반응 혼합물에 남아있는 PrP^{Sc} 는 항체에 의해 결합되며 항체에 연결된 효소를 사용하여 검출한다.
- <62> 표 1에 기재된 용액의 100 mL 분액을 약 1 μg 의 재조합 프리온 단백질로 스파이킹 (spiking)하였고 프리오닉스-체크를 어펜딕스 (Appendix) 1에 기재된 방법에 따라 수행하였다.
- <63> PrP^{Sc} 를 효소적 분해 이후에 검출했을 때 그 결과는 양성으로 기록되었다. 표 1은 대조군 실험 1-1 내지 6-1에서 분자량이 14.4 kDa보다 큰 단편을 PrP^{Sc} 로서 검출하였음을 보여준다. 그러나 실험 1-2 내지 6-2에서는 분자량이 14.4 kDa보다 큰 단편이 검출되지 않았고 PrP^{Sc} 도 검출되지 않았다.
- <64> 1-1은 70 $^{\circ}\text{C}$, 30분에서 효과적인 것으로 나타난 언폴딩 작용제 (3% DOBS)를 포함하므로 1-2와 다르다. 2-2 및 3-2는 초음파분해를 포함하므로 2-1 및 3-1과 각각 다르다. 2-2에서 25% 테릭 (Terric) 164 (폴딩 작용제)와 조합한 언폴딩 작용제 3% DOBS는 25 $^{\circ}\text{C}$, 40kHz의 초음파분해에서 효과적이었다. 3-2에서는, 2.6 mHz에서 언폴딩 작용제로서 10% SDS 및 폴딩 작용제로서 양쪽이온성 계면활성제를 사용하여 유사한 결과를 얻었다. 4-2는 더 증가된 온도에서 SDS와 보락스 (borax)를 조합하므로 4-1과는 다르다. 5-2는 보론 부재하에 트리톤 (Triton) X-100과 DOBS를 조합하므로 5-1과는 다르다. 6-2는 가역적으로 언폴딩하는 DMSO 농도 (0.05%)로부

터 비가역적으로 언폴딩하는 DMSO 농도 (0.5%)까지 증가시키므로 6-1과는 다르다.

<65> 당업자라면 본원에 교시된 본 발명의 개념에서 벗어나지 않으면서 본원의 교시 내용으로부터 다른 작용제 조합을 사용하여 본 발명을 수행할 수 있다는 것을 분명히 알 것이다.

표 1-1

<66>

번호	시험 방법/용액	SDS-PAGE 알부민	SDS-PAGE 베타-갈락 토시다제	SDS-PAGE 미오신	프리오닉스 -체크
1-1	증류수 70 °C로 가온 70 °C에서 30분 동안 수조에서 유지, ml 당 프로테아제 활성 15 단 위, pH 9 25 °C로 냉각	+	+	+	+
1-2	1:100으로 희석한 3% DOBS 및 증류 수 70 °C로 가온 70 °C에서 30분 동안 수조에서 유지, ml 당 프로테아제 활성 15 단 위, pH 9 25 °C로 냉각	-	-	-	-
2-1	1:100으로 희석한 3% DOBS 및 25% 테릭 164 ml 당 프로테아제 활성 15 단위, pH 9 25 °C에서 30분 동안	+	+	+	+
2-2	1:100으로 희석한 3% DOBS 및 25% 테릭 164 ml 당 프로테아제 활성 15 단위 25 °C에서 30분 동안 40 kHz 초음파 로 초음파분해	-	-	-	-
3-1	1:100으로 희석한 10% SDS 및 10% 엠펜젠(Empigen) BS/AU (양쪽이온성 계면활성제) ml 당 프로테아제 활성 15 단위, pH 9 25 °C에서 30분 동안	+	+	+	+
3-2	1:100으로 희석한 10% SDS 및 10% 엠펜젠 BS/AU (양쪽이온성 계면활성 제) ml 당 프로테아제 활성 15 단위, pH 9 25 °C에서 30분 동안 2.6 mHz로 초 음파분해	-	-	-	-

표 1-2

<67>

번호	시험 방법/용액	SDS-PAGE 알부민	SDS-PAGE 베타-갈락 토시다제	SDS-PAGE 미오신	프리오닉스 -체크
4-1	1:100으로 희석한 10% SDS 및 4% 보락스 ml 당 프로테아제 활성 15 단위, pH 9 25 °C에서 30분 동안	+	+	+	+

4-2	1:100으로 희석한 10% SDS 및 4% 보락스 ml 당 프로테아제 활성 15 단위, pH 9 55 °C에서 30분 동안	-	-	-	-
5-1	1:100으로 희석한 15% DOBS, 5% 트리톤 X-100 및 4% 보락스 ml 당 프로테아제 활성 15 단위, pH 9 25 °C에서 30분 동안	+	+	+	+
5-2	1:100으로 희석한 15% DOBS, 5% 트리톤 X-100 ml 당 프로테아제 활성 15 단위, pH 9 25 °C에서 30분 동안	-	-	-	-
6-1	0.05% DMSO ml 당 프로테아제 활성 15 단위, pH 9 25 °C에서 30분 동안	+	+	+	+
6-2	0.5% DMSO ml 당 프로테아제 활성 15 단위, pH 9 25 °C에서 30분 동안	-	-	-	-

<68> DOBS = 도데실 벤젠 술폰산 (시그마 제품 번호 제D2525호)

<69> DMSO = 디메틸설폭시드 (시그마 제품 번호 제D5879호)

<70> 프로테아제 = 서브틸린 칼스버그 (Subtilisin Carlsberg)(시그마 제품 번호 제P5380호)

<71> 40 kHz에서의 초음파분해는 유니소닉스 (UNISONICS Pty Ltd.)사에 의해 공급된 초음파 조를 사용하여 수행하였다.

<72> 2.6 MHz에서의 초음파분해는 디소닉스 (DISONICS Pty Ltd.)사의 초음파 분무장치를 사용하여 수행하였다.

<73> 어펜딕스 1

<74> 프리온의 체크 시험 방법

<75> 대표적인 천연 감염제로 알려진 재조합 공급원으로부터 PrP^{Sc}의 프로테아제 내성 코어를 사용하는 프로토콜을 하기에 약술한다. 프리온의 프로테아제 내성 코어는 감염성이 아니지만 감염제의 존재를 나타낸다는 것을 실험적으로 입증하였다.

<76> 1. PrP^{Sc} 1 μ g 또는 PrP^{Sc} 1 mcg을 함유하는 BSE 감염된 동물의 뇌 균질물을 칭량하여 탈이온수 1 ml 중에 재구성한다.

<77> 2. 시험 용액 10 ml를 가하고 적절한 불활성 프로토콜을 수행한다.

<78> 3. 시험 용액의 10 μ l 분액을 취하고 이를 시험 완충액 10 μ l에 가한다.

<79> 4. - 스콰이킹에 사용되는 미처리 PrP^{Sc} 용액 (양성 대조군)

<80> - 연구용 용액의 SDS-PAGE를 수행한다.

<81> 모든 단백질 또는 단백질 단편을 이들의 크기에 따라 전기장에서 분리시킨다. 작은 단백질은 큰 단백질 보다 빨리 이동한다. 일정 시간 후, 내성 PrP^{Sc} 단편은 겔의 더 아래쪽 절반에 존재하지만 분해된 프리온 단백질의

가장 작은 단편은 겔을 빠져나간다. 프리온 단백질이 프로테아제에 대해 내성으로 남아있는 대조군 샘플에서는, 절단되지 않은 PrP^{Sc} 분자가 겔의 더 위쪽에 남아있다.

- <82> 1. 웨스턴 블롯팅에 의해 겔로부터 니트로셀룰로스 막으로 단백질을 전달한다.
- <83> 2. 모노클로날 항체 (프리온릭스 제품 제01-020호)를 첨가한다.
- <84> 3. 단백질과 결합시킨 후 결합되지 않은 항체를 세척하여 제거한다.
- <85> 4. 일차 항체와 컨쥬게이션된 호스래디쉬-퍼옥시다제를 화학발광성 기질 (아머샴 라이프 사이언스 (AMERSHAM Life Science)사에서 공급된 ECL 제품 제RPN 2209호)과 반응시킨다.
- <86> 5. 막을 X-선 필름에 노출시키고 필름을 현상한다.
- <87> 6. 10. 프리온 단백질이 존재하는지를 확인한다. 항체가 프리온 단백질의 분자량에 상응하는 위치에 있는 경우 결과를 양성으로 기록한다.

专利名称(译)	如何消毒朊病毒		
公开(公告)号	KR100927494B1	公开(公告)日	2009-11-17
申请号	KR1020037010430	申请日	2002-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	新药研究(澳大利亚)有限公司		
申请(专利权)人(译)	新星农场调查 (澳大利亚) 和血小板这么美的		
当前申请(专利权)人(译)	新星农场调查 (澳大利亚) 和血小板这么美的		
[标]发明人	KRITZLER STEVEN 크리츨러스티븐 SAVA ALEX 사바알렉스 ZALUNARDO MICHAEL 잘루나르도마이클		
发明人	크리츨러,스티븐 사바,알렉스 잘루나르도,마이클		
IPC分类号	A61L2/16 A61B19/00 A01N63/00 A61L2/00 A61L2/02 A61L2/025 A61L2/08 C12S5/00 C12S9/00		
CPC分类号	A01N63/00 A61L2/0082 A61L2/025 A61L2/085 A61L2/12 A61L2/16 A61L2202/24		
代理人(译)	Jangsugil 金荣		
优先权	2001PR2938 2001-02-07 AU		
其他公开文献	KR1020030077610A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于处理被PrPScprion蛋白或其替代物污染的表面，悬浮液或溶液的方法和组合物。所述方法和组合物使用一种或多种酶的组合，所述酶有效地将朊病毒蛋白切割成具有非感染性分子量的片段，并且选择一种或多种试剂以促进PrPScprion蛋白的构象去折叠而不使一种或多种酶变性。。

번호	시험 방법/용액	SDS-PAGE 알부민	SDS-PAGE 베타-갈락 토시타제	SDS-PAGE 비오신	프리요닉스 -체크
1-1	증류수 70 ℃로 가온 70 ℃에서 30분 동안 수조에서 유지, ml 당 프로테아제 활성 15 단 위, pH 9 25 ℃로 냉각	+	+	+	+
1-2	1:100으로 희석한 3% DOBS 및 증류 수 70 ℃로 가온 70 ℃에서 30분 동안 수조에서 유지, ml 당 프로테아제 활성 15 단 위, pH 9 25 ℃로 냉각	-	-	-	-
2-1	1:100으로 희석한 3% DOBS 및 25% 타워 164 ml 당 프로테아제 활성 15 단위, pH 9 25 ℃에서 30분 동안	+	+	+	+
2-2	1:100으로 희석한 3% DOBS 및 25% 타워 164 ml 당 프로테아제 활성 15 단위 25 ℃에서 30분 동안 40 kHz 초음파 로 초음파분해	-	-	-	-
3-1	1:100으로 희석한 10% SDS 및 10% 엘피젠(Empigen) BS/AU (양쪽이온성 계면활성제) ml 당 프로테아제 활성 15 단위, pH 9 25 ℃에서 30분 동안	+	+	+	+
3-2	1:100으로 희석한 10% SDS 및 10% 엘피젠 BS/AU (양쪽이온성 계면활성 제) ml 당 프로테아제 활성 15 단위, pH 9 25 ℃에서 30분 동안 2.6 mHz로 초 음파분해	-	-	-	-