



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02808204.4

[43] 公开日 2004 年 7 月 28 日

[11] 公开号 CN 1516740A

[22] 申请日 2002.3.22 [21] 申请号 02808204.4
 [30] 优先权
 [32] 2001. 4. 12 [33] US [31] 09/834,284
 [32] 2001. 10. 26 [33] US [31] 10/007,613
 [86] 国际申请 PCT/US2002/008982 2002. 3. 22
 [87] 国际公布 WO2002/083082 英 2002. 10. 24
 [85] 进入国家阶段日期 2003. 10. 13
 [71] 申请人 百瑞国际公司
 地址 美国北卡罗来纳州
 [72] 发明人 石家兴

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
 任公司
 代理人 王维玉 薛俊英

权利要求书 8 页 说明书 24 页 附图 2 页

[54] 发明名称 破坏感染性朊病毒蛋白的组合物及方法

[57] 摘要

本发明公开了一种破坏感染性朊病毒蛋白的方法和组合物，该朊病毒蛋白与传染性海绵状脑病(TSE)和/或其它由朊病毒蛋白引起的疾病有关，通过用破坏朊病毒的蛋白酶进行热/酶处理感染性朊病毒蛋白。该方法和组合物用于处理含感染性朊病毒或被感染性朊病毒蛋白菌株污染的组织，或者用于对朊病毒污染的物品，例如外科器械、厨房用具、实验仪器等的消毒或杀菌。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 在被感染性朊病毒蛋白污染或怀疑被感染性朊病毒蛋白污染的位点处减少感染性朊病毒蛋白的处理方法，该方法包括步骤：

5 (a) 加热位点至足够高的温度并保持该温度足够长的时间，以提高所在位点的感染性朊病毒蛋白的蛋白水解敏感性；

 (b)将已加热的位点暴露于蛋白水解酶中，以使该位点至少部分有效地减少传染性蛋白朊病毒。

10 2. 权利要求 1 的方法，其中步骤(a)的温度不超过约 150℃。

 3. 权利要求 1 的方法，其中步骤(a)的温度在约 100℃至约 150℃之间。

15 4. 权利要求 1 的方法，其中步骤(a)的温度在约 125℃至约 140℃之间。

 5. 权利要求 1 的方法，其中步骤(b)在约 35℃至约 100℃之间的温度下进行。

20 6. 权利要求 1 的方法，其中步骤(b)在高于约 40℃的温度下进行。

 7. 权利要求 1 的方法，其中步骤(b)在高于约 50℃的温度下进行。

25 8. 权利要求 1 的方法，其中步骤(b)在低于步骤(a)的温度下进行。

 9. 权利要求 1 的方法，其中步骤(b)在约 40℃至约 75℃之间的温度下进行。

30 10. 权利要求 1 的方法，其中步骤(b)在约 50℃至约 60℃之间的

温度下进行。

11. 权利要求 1 的方法，其中蛋白水解酶包括选自下述的酶：角蛋白酶、蛋白酶 K、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、凝乳酶、
5 组织蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、弹性蛋白酶、胶原酶、肽链内切酶、
肽酶、寡肽酶、嗜热菌蛋白酶、bacillolysin、mycilylins、羧肽酶类、
亮氨酸氨基肽酶、氨基肽酶、极热嗜菌蛋白酶、羧基水解酶、木瓜蛋白酶、胰酶、链激酶、链脱酶、无花果蛋白酶、羧肽酶、木瓜凝乳蛋白酶以及菠萝蛋白酶。

10

12. 权利要求 1 的方法，其中蛋白水解酶包括角蛋白酶和/或其活性片段。

15

13. 权利要求 1 的方法，其中蛋白水解酶包括地衣芽孢杆菌 PWD-1 酶和/或其活性片段。

14. 权利要求 1 的方法，该方法还包括步骤(c)检验所述位点以证实感染性朊病毒蛋白已减少。

20

15. 权利要求 14 的方法，其中检验步骤(c)包括将所述位点用蛋白质印迹试验、三明治免疫分析试验、ELISA、荧光免疫分析试验、毛细管免疫电泳试验以及纤维蛋白溶酶原界限试验的方法进行检验。

25

16. 权利要求 14 的方法，其中检验步骤(c)包括将所述位点用蛋白质印迹试验法进行检验。

17. 权利要求 1 的方法，其中所述的位点包括含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的组织。

30

18. 权利要求 17 的方法，其中所述的组织包括哺乳动物组织。

19. 权利要求 17 的方法，其中所述的组织包括神经系统组织。
20. 权利要求 17 的方法，其中所述的组织包括牛组织。
- 5
21. 权利要求 17 的方法，其中所述的组织包括感染 BSE 的组织。
22. 权利要求 17 的方法，其中所述的组织包括羊组织。
- 10
23. 权利要求 17 的方法，其中所述的组织包括感染瘙痒病的组织。
24. 权利要求 17 的方法，其中所述的组织选自脑、垂体、肠、肺、心脏、肾以及脾组织。
- 15
25. 权利要求 17 的方法，其中所述的组织来自一种携带感染性朊病毒蛋白的动物。
26. 权利要求 1 的方法，其中所述的位点包括易受感染性朊病毒蛋白污染的物品。
- 20
27. 权利要求 26 的方法，其中所述的物品包括外科器械。
28. 权利要求 27 的方法，其中所述的外科器械选自钳、镊子、剪刀、刀、电缆、钻孔器、钳子、插管、卡钳、雕刻器、刮匙、刮刀器、扩张器、夹钳涂药器、收缩装置、收缩器、挖器、针托、吸管、凝固电极、脑电图仪的深度电极、肋骨和胸骨扩张器、双极探针以及肋骨剪。
- 25
29. 权利要求 26 的方法，其中所述的物品包括刀具和厨房用具。
- 30

30. 权利要求 29 的方法，其中所述的工具和厨房用具选自刀、叉、剪刀、去皮机、削皮刀、切片机、刮铲、以及切肉刀。

5 31. 权利要求 26 的方法，其中所述的物品包括实验仪器。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述的实验仪器选自容器、过滤装置、离心机、分光光度计以及荧光计。

10 33. 权利要求 26 的方法，其中所述的物品包括兽医装置。

34. 权利要求 33 的方法，其中所述的兽医装置选自钳、镊子、刀、锯、探针以及电子击昏设备。

15 35. 权利要求 1 的方法，其中所述的蛋白水解酶包括蛋白酶。

36. 权利要求 35 的方法，其中蛋白酶包括羧基水解酶。

37. 权利要求 36 的方法，其中羧基水解酶包括枯草杆菌蛋白酶。

20 38. 权利要求 37 的方法，其中枯草杆菌蛋白酶包括野生型的淀粉液化芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的变体，包含一种或多种氨基酸置换、添加或删除。

25 39. 通过蛋白水解酶促降解处理以提高感染性朊病毒蛋白的降解性的方法，该方法包括(a)将朊病毒蛋白加热至低于朊病毒蛋白热解破坏的温度，接着(b)进行朊病毒蛋白的酶促降解处理。

30 40. 从包含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的牛组织中除去感染性朊病毒蛋白的方法，该方法包括(a)在约 100°C 至约 150

°C的温度范围内蒸煮所述的牛组织，接着(b)在约 35°C至约 100°C的温度范围内将该牛组织暴露于热稳定的蛋白水解酶中，以有效地进行蛋白水解，至少部分破坏所述牛组织中的感染性朊病毒蛋白。

5 41. 权利要求 40 的方法，其中所述的蒸煮进行约 5 分钟至约 5 小时。

 42. 权利要求 40 的方法，其中蛋白水解酶包括地衣芽孢杆菌 PWD-1 角蛋白酶。

10

 43. 降解感染性朊病毒蛋白的方法，该方法包括(a)在第一高温范围内将感染性朊病毒蛋白加热，接着(b)在第二高温范围内将感染性朊病毒蛋白冷却至较低的高温，以及(c)将感染性朊病毒蛋白在此较低的高温下有效的暴露于蛋白水解酶中，以将感染性朊病毒蛋白降解为良性的降解产物。

15

 44. 至少部分降解包含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的组织或物品中的感染性朊病毒蛋白的方法，该方法包括步骤：在足够高的温度下和足够长的时间内，加热该组织或物品并同时将其暴露于热稳定的蛋白水解酶中，以至少部分降解在组织或物品中的感染性朊病毒蛋白。

20

 45. 破坏可介导 BSE 的感染性朊病毒蛋白的动物肉制品或其副产品的加工方法，该方法包括：在足够高的温度下和足够长的时间内用耐热的蛋白酶处理所述动物肉制品或其副产品，以破坏介导 BSE 的感染性朊病毒蛋白。

25

 46. 一种组织组合物，其中包括含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的组织，以及在约 35°C至约 100°C的温度范围内热稳定的蛋白水解酶。

30

47. 处理组织以减少感染性朊病毒蛋白的方法，该方法包括以下步骤：

5 (a) 加热组织至足够高的温度并保持该温度足够长的时间，以提高所述组织中传染性朊病毒蛋白的蛋白水解敏感性；和

(b)将已加热的组织暴露于蛋白水解酶中，以使该组织至少部分有效地减少传染性蛋白朊病毒。

10 48. 消毒易被感染性朊病毒蛋白污染的物品的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 在足够高的温度下将所述的物品加热足够长的时间，以提高所述物品上朊病毒蛋白的蛋白水解敏感性；和

(b)将已加热的物品暴露于蛋白水解酶中，以至少部分有效地减少所述物品上的感染性朊病毒蛋白。

15

49. 从被感染性朊病毒蛋白污染的外科器械中除去感染性朊病毒蛋白的方法，该方法包括(a)在约 100°C至约 150°C的温度范围内将该外科器械加热，接着(b)在约 35°C至约 100°C的温度范围内，将所述已加热的外科器械暴露于热稳定的蛋白水解酶中，以至少部分有效地破坏污染所述外科器械的感染性朊病毒蛋白。

20

50. 消毒易受感染性朊病毒蛋白污染的地物的清洗组合物，所述的组合物包括：

25 (i) 一种或多种蛋白水解蛋白质，选自角蛋白酶、蛋白酶 K、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、凝乳酶、组织蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、弹性蛋白酶、胶原酶、肽链内切酶、肽酶、寡肽酶、嗜热菌蛋白酶、bacillolysin、mycilysins、羧肽酶类、亮氨酰氨基肽酶、氨基肽酶、极热嗜菌蛋白酶、羧基水解酶、木瓜蛋白酶、胰酶、链激酶、链脱酶、无花果蛋白酶、羧肽酶、木瓜凝乳蛋白酶以及菠萝蛋白酶；

30 和

(ii) 溶剂。

51. 权利要求 50 的清洗组合物，其中包括角蛋白酶。

5 52. 权利要求 51 的清洗组合物，其中所述的角蛋白酶的浓度在约 0.2g/L 至约 1.0g/L 的范围内。

53. 权利要求 50 的清洗组合物，其中溶剂选自蒸馏水、醇、缓冲溶液以及洗涤液。

10

54. 权利要求 50 的清洗组合物，其中还包括一种或多种选自表面活性剂、助洗剂、助促进剂和填料的化学添加剂。

15

55. 减少其中的感染性朊病毒蛋白的组织处理方法，该方法包括以下步骤：

(a) 在至少 40°C 的温度下将组织加热足够长的时间，以提高所在组织的感染性朊病毒蛋白的蛋白水解的敏感性；和

(b) 将已加热的组织暴露于蛋白水解酶中，以使该组织至少部分有效地减少传染性蛋白朊病毒。

20

56. 降解感染性朊病毒蛋白的方法，该方法包括(a)在第一高温范围内加热感染性朊病毒蛋白，所述第一高温高于 60°C 但低于所述朊病毒蛋白的热解破坏温度，接着(b)在第二高温范围内，将感染性朊病毒蛋白冷却至较低的高温，接着(c)在此较低的高温下将感染性朊病毒蛋白有效的暴露于蛋白水解酶中，以将感染性朊病毒蛋白降解为良性的降解产物。

25

57. 在包含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的组织中至少部分降解感染性朊病毒蛋白的方法，该方法包括以下步骤：在高于 40°C 但低于朊病毒蛋白的热解破坏温度下以及在足够长的时间内

30

加热该组织，同时将其暴露于热稳定的蛋白水解酶中，以至少部分降解感染性朊病毒蛋白。

5 58. 加工处理动物肉制品或其副产品以清除其中家道 BSE 的感染性朊病毒蛋白的方法，该方法包括：在高于 60°C 但低于朊病毒蛋白热解破坏温度下，用耐热的蛋白酶处理动物肉制品或其副产品足够长的时间，以破坏其中介导 BSE 的感染性朊病毒蛋白。

10 59. 组织组合物，其中包括含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的组织，以及一种选自角蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、凝乳酶、组织蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、弹性蛋白酶、胶原酶、肽链内切酶、肽酶、寡肽酶、嗜热菌蛋白酶、bacillolysin、mycilysins、羧肽酶、亮氨酰氨基肽酶、氨基肽酶、以及极嗜热菌蛋白酶的蛋白水解酶。

15

60. 动物肉制品或其副产品的加工方法，该方法包括在高于 40°C 但低于朊病毒蛋白的热解破坏温度下，用能有效破坏任何与此有关的感染性朊病毒蛋白的蛋白酶处理所述动物肉制品或其副产品足够长的时间。

20

61. 在被感染性朊病毒蛋白污染或怀疑被感染性朊病毒蛋白污染的位点上减少感染性朊病毒蛋白的处理方法，该方法包括以下步骤：

(a) 在至少 40°C 下加热位点足够长的时间，以提高所在位点的感染性朊病毒蛋白的蛋白水解敏感性；和

25

(b) 将已加热的位点暴露于蛋白水解酶中，以使该位点至少部分有效地减少感染性蛋白朊病毒。

破坏感染性朊病毒蛋白的组合物及方法

5 发明领域

本发明涉及破坏与可传染的海绵状脑病(TSE)例如牛海绵状脑病(BSE)和羊瘙痒病有关的感染性朊病毒蛋白的组合物及方法。更具体地说,本发明涉及破坏动物组织中感染性朊病毒蛋白的蛋白酶的应用,和/或将该蛋白酶应用于被这种感染性朊病毒蛋白污染的卫生器材以及类似物品的消毒和杀菌。

15 发明背景

朊病毒蛋白是构象不规则蛋白,它与人类以及非人类哺乳动物物种中的感染性神经变性疾病有关。

在非人类哺乳动物物种中的朊病毒疾病包括瘙痒病(羊)、可传染的貂脑病(貂)、慢性消耗性疾病(麋、鹿)、牛海绵状脑病(BSE)(牛)、猫海绵状脑病(猫)以及猴海绵状脑病(猴)。

20 病因上与朊病毒蛋白有关的人类的各种神经变性疾病包括:克雅氏病、格-施-沙综合症、严重失眠、库鲁病以及克雅氏病变种。人类朊病毒疾病的发病机理与食肉动物(BSE感染的牛,引起新的克雅氏病变种)、人类生长激素给药(引起医原性的克雅氏病)以及强迫性恶性细胞吞噬作用(引起库鲁病)有关。

25 自从1992年以来,在欧洲已经报道了超过180,000个BSE病例以及100个人类克雅氏病病例,预计人类的克雅氏病病例将显著增长。由于这种疾病目前还没有治疗方法,而且病原性的朊病毒蛋白是顽固的并且是非免疫遗传的,因此很难控制这种疾病的蔓延。病原性的和感染性的朊病毒蛋白质的同型异构体是很稳定的,其具有丰富的 β 折叠

结构,并且耐热及耐普通的蛋白水解酶(Prusiner, S.B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,95,11363 (1998); Cohen, F. E. 和 Prusiner, S. B., Ann. Rev. Biochem., 67,793 (1998);以及 Pan, K-M, Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., 和 Prusiner, S. B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 90,10962 (1993))。

目前研究主要集中于 BSE、被朊病毒蛋白污染的源自牛的人类食品、以及牛物种身上的朊病毒蛋白疾病的生殖和繁衍。在牛群中的传染与牛用包含骨粉和从感染的牛、羊以及其他反刍动物中提炼的器官和组织的饲料饲养有关。

目前,在许多国家,对不是提供人类食品的畜产品以及不是提供用于动物饲料的原材料和营养增补剂的活的来源的畜牧副产品进行焚化并将其骨灰残余物埋入地下,以防止从存在感染性朊病毒蛋白的动物身上传播朊病毒蛋白。

在欧洲,来自畜牧副产品的肉骨粉已经禁止在饲料中使用。在美国,虽然还没有爆发 BSE 的报告,然而畜牧业以及其提炼与加工工业已经制定了严格的措施以防止该疾病的发生及蔓延(Franco, B.A., Feed Stuffs, 2001 年 2 月 12 日)。另外,美国已经禁止肉以及肉类副产品的进口。

目前已经研究出在动物组织中是否存在感染性朊病毒蛋白的各种检验方法,包括蛋白质印迹试验、三明治免疫分析试验、酶联免疫吸附试验(ELISA)、荧光免疫分析试验、毛细管免疫电泳试验以及纤维蛋白溶酶原界限试验(Genetic Engineering News,Vol.21,No.6, 2001 年 3 月 15 日),但是迄今为止,工业上合适的从感染的动物组织中除去感染性朊病毒蛋白的相应能力并无进展。

30

用常规方法，变性而不是降解构象规则的蛋白，所述方法包括例如高压蒸气处理(甚至温度高达 200 ，都不能有效地使感染性朊病毒蛋白失活)、煮沸、冻结、以及暴露于试剂例如甲醛、石碳酸以及氯仿中，难以破坏感染性朊病毒蛋白。通常，采用焚化或漂白处理的方法破坏朊病毒蛋白的病原性同型异构体。

因此，提供一种破坏感染性朊病毒蛋白的组合物和方法将是本领域的一项重大的进步，所述组合物和方法适用于处理生物材料，例如包含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的动物组织。

此外，由先前暴露于朊病毒感染的组织下的医疗器械的重复使用引起的交叉污染变得越来越危险并且成为传播感染的潜在因素。

为防止在卫生保健期间通过医疗器械的交叉污染，对卫生保健器件和工具使用抗菌剂、消毒剂进行灭菌是非常关键的。可以通过各种常规的方法，使用各种破坏感染的生物材料，例如细菌或病毒，的物理和化学方法，对卫生器材或仪器进行消毒和灭菌。例如，可以使用化学消毒剂如过乙酸、过氧化氢、氢氧化钠、甲酸、漂白剂、醇、环氧乙烷、甲醛、福尔马林、以及戊二醛对卫生器材进行消毒和杀菌。焚化、高压蒸气处理、冻结、干热、煮沸、紫外线辐射以及微波辐射同样可以用于破坏常见的传染物例如细菌和病毒。

然而，如上文论述，众所周知感染性朊病毒蛋难以用常规方法进行破坏，因此用常规方法对朊病毒污染的卫生器材或类似物品进行消毒或杀菌是无效的。

因此，本发明的另一个目的是提供一种对朊病毒感染的卫生器材例如手术器械或类似物品例如厨房用具以及实验仪器进行有效消毒或杀菌的组合物和方法。

发明概述

本发明提供了破坏感染性朊病毒蛋白的方法和组合物。

一方面，本发明涉及在被感染性朊病毒蛋白污染的位点上减少感染性朊病毒蛋白的处理方法，该方法包括步骤：

(a) 加热该位点至足够高的温度并保持该温度足够长的时间，以提高该位点上的感染性朊病毒蛋白的蛋白水解敏感性；和

(b)将已加热的位点暴露于蛋白水解酶中，所述酶在该位点至少能部分有效地减少感染性蛋白朊病毒。

10

所述的位点可以是包含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的组织，或者可以是易被感染性朊病毒蛋白污染的物品。

步骤(a)的温度不超过约 150°C，优选在约 100°C至约 150°C的范围内，更优选在约 125°C至约 140°C的范围内。

步骤(b)的温度要比步骤(a)的温度低，例如:(1)在约 35°C至约 100°C的范围内，(2)在约 40°C至约 75°C的范围内，(3)在约 50°C至约 60°C的范围内。步骤(b)优选在高于约 40°C的温度，更优选在高于约 50°C的温度下进行。

20

用于步骤(b)中的蛋白水解酶包括，但不限于，角蛋白酶、蛋白酶K、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、凝乳酶、组织蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、弹性蛋白酶、胶原酶、肽链内切酶、肽酶、寡肽酶、嗜热菌蛋白酶、bacillolysin、mycilysins、羧肽酶类、亮氨酰氨基肽酶、氨基肽酶、极热嗜菌蛋白酶、羧基水解酶、木瓜蛋白酶、胰酶、链激酶、链脱酶、无花果蛋白酶、羧肽酶、木瓜凝乳蛋白酶以及菠萝蛋白酶。对于本发明的实践，角蛋白酶和/或其活性片段是特别优选的。角蛋白酶通常是一组已知的能够分解角蛋白的蛋白水解酶，它们是羽毛、角、蹄以及毛发的主要成分。本申请的发明人意外并惊奇地发现：

30

角蛋白酶在破坏感染性朊病毒蛋白中同样有效，特别是如果感染性朊病毒蛋白已经进行过加工，使其对蛋白水解变得更敏感。这种蛋白水解酶更优选地衣芽孢杆菌 (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1 角蛋白酶和/或其活性片段。或者，这种蛋白水解酶是一种野生型的淀粉液化芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶(*Bacillus amyloliquefaciens subtilisin*)的变异体，包括一种或多种氨基酸置换、添加或删除。

此外，上文中描述的方法还可以包括步骤(c)检验位点以证实在那里感染性朊病毒蛋白已减少，该步骤包括:将该位点用选自蛋白质印迹试验、三明治免疫分析试验、ELISA、荧光免疫分析检验、毛细管免疫电泳试验和纤维蛋白溶酶原界限试验的方法进行测试。本发明优选用蛋白质印迹法进行检验。

如上文描述，本发明的一个具体方面涉及在被感染性朊病毒蛋白污染的或怀疑被感染性朊病毒蛋白污染的位点上减少感染性朊病毒蛋白的处理方法，其中所述位点包括含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的组织。这些组织包括动物组织，优选包括哺乳动物组织例如牛组织、羊组织等等。也可来自这些动物身体的任何部分，例如脑、垂体、肠、肺、心脏、肾以及脾组织。动物组织优选包括神经系统组织,更优选包括 BSE 感染的或瘙痒病感染的组织。它可以从携带感染性朊病毒蛋白的动物中获得。

如上文描述，本发明的另一个具体方面涉及在被感染性朊病毒蛋白污染的或怀疑被感染性朊病毒蛋白污染的位点上减少感染性朊病毒蛋白的处理方法，其中所述位点包括易受感染性朊病毒蛋白污染的物品。这些物品可能包括外科器械例如钳(clamps)、镊子(forceps)、剪刀、刀、电缆、钻孔器、钳子(tweezers)、插管、卡钳、雕刻器、刮匙、刮刀器、扩张器、夹钳涂药器、收缩装置、收缩器、挖器、针托、吸管、凝固电极、脑电图仪的深度电极、肋骨和胸骨扩张器、双极探针以及肋骨剪。另外，这些物品可能包括刀具和厨房用具例如刀、叉、剪刀、

去皮机、削皮刀、切片机、刮铲以及切肉刀，或实验仪器例如容器、过滤装置、离心机、分光光度计以及荧光计，或兽医装置例如钳、镊子、刀、锯、探针以及电子击昏设备。

5 当被处理的位点中包含物品时，为了净化和消毒这些物品，步骤(b)中使用的蛋白水解酶优选以溶液的形成提供。当角蛋白酶用作蛋白水解酶时，这种酶溶液以低有效浓度为特征，该浓度优选在约 0.2g/L 至约 1.0g/L 的范围内。

10 本发明的另一方面涉及通过蛋白水解酶促降解处理以提高感染性朊病毒蛋白的降解性的方法，包括(a)将朊病毒蛋白加热至低于朊病毒蛋白的热解破坏温度，接着(b)进行朊病毒蛋白的酶促降解处理。

15 本发明的更进一步方面涉及从包含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的牛组织中除去感染性朊病毒蛋白的方法，该方法包括(a)在约 100°C 至约 150°C 的温度范围内蒸煮牛组织，接着(b)在约 35 °C 至约 100°C 的温度范围内将该牛组织暴露于热稳定的蛋白水解酶中，其中该蛋白水解酶有效地对感染性朊病毒蛋白进行蛋白水解，至少部分破坏牛组织中的感染性朊病毒蛋白。蒸煮优选进行约 5 分钟至
20 约 5 小时，步骤(b)中使用的蛋白水解酶优选包括地衣芽孢杆菌 PWD-1 角蛋白酶。

25 就本发明的实践，热稳定的蛋白水解酶是特别有用的。因此，本发明的一个具体方面涉及通过下面步骤在包含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的组织中至少部分降解感染性朊病毒蛋白的方法，所述步骤包括：加热该组织并同时使其在足够高的温度下，在热稳定的蛋白水解酶中暴露足够长的时间，以使感染性朊病毒蛋白至少部分降解；本发明的另一具体方面涉及组织组合物，该组织组合物包括含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的组织以及在约 35
30 °C 至约 100°C 的温度范围内热稳定的蛋白水解酶。这种热稳定的蛋白

水解酶优选是耐热的蛋白酶，其可用于在足够高的温度下和足够长的时间内处理动物肉制品或其副产品以破坏其中引起 BSE 的感染性朊病毒蛋白。

5 本发明的另外一个方面涉及减少感染性朊病毒蛋白的组织处理方法。该方法包括步骤：

(a) 在足够高的温度下将组织加热足够长的时间，以提高该组织中感染性朊病毒蛋白的蛋白水解降解性；和

10 (b)将所述已加热的组织暴露于蛋白水解酶中，使其至少部分有效地减少该组织中的感染性朊病毒蛋白。

本发明的另一方面涉及消毒易被感染性朊病毒蛋白污染的物品的方法，该方法包括步骤：

15 (a) 在足够高的温度下将所述的物品加热足够长的时间，以提高所述物品上的朊病毒蛋白的蛋白水解敏感性；和

(b)将所述已加热的物品暴露于蛋白水解酶中，以至少部分有效地减少所述物品上的感染性朊病毒蛋白。

20 另一方面，本发明涉及从被感染性朊病毒蛋白污染的外科器械中除去感染性朊病毒蛋白的方法，该方法包括(a)在约 100°C至约 150°C的温度范围内将所述外科器械加热例如约 5 分钟至约 5 小时，接着(b)在约 35°C至约 100°C的温度范围内，将所述已加热的外科器械暴露于热稳定的蛋白水解酶中，以至少部分有效地破坏污染该外科器械上的感染性朊病毒蛋白。

25 本发明的更进一步方面涉及用于消毒易被感染性朊病毒蛋白污染的物品清洗组合物，所述的组合物包括：

30 (i) 一种或多种蛋白水解酶，选自角蛋白酶、蛋白酶 K、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、凝乳酶、组织蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、弹性蛋白酶、胶原酶、肽链内切酶、肽酶、寡肽酶、嗜热菌蛋白

酶、bacillolysin、mycilylins、羧肽酶类、亮氨酰氨基肽酶、氨基肽酶、极热嗜菌蛋白酶、羧基水解酶、木瓜蛋白酶、胰酶、链激酶、链脱酶、无花果蛋白酶、羧肽酶、木瓜凝乳蛋白酶以及菠萝蛋白酶；和

(ii) 溶剂。

5

本发明的清洗组合物优选包括浓度在约 0.2g/L 至约 1.0g/L 范围内的角蛋白酶。本发明可以使用各种溶剂，例如蒸馏水、缓冲溶液、洗涤液、醇、或任何其它的用于酶洗涤剂的无机或有机溶剂，这些可以容易地由本领域普通技术人员确定，无需经过试验。清洗组合物更
10 优选进一步包括一种或多种提高消毒/灭菌效果的化学添加剂，其包括但不局限于：表面活性剂、助洗剂、助促进剂、填料及其他助剂。

其它方面，本发明的特点和实施方案将随下面的公开和后附的权利要求书变得更加清楚。

15

附图简要说明

图 1 和 2 表示在 SDS-PAGE 凝胶上的凝胶电泳/蛋白质印迹结果，证明本发明的方法对破坏感染性朊病毒蛋白的效力。

20

发明详述和优选实施方案

下面将更详细地描述本发明及其特征、各个方面和实施方案，在发明的背景技术中引用的公开技术文献，以及下面的专利和技术文献，他们各自完整地在此引入作为参考：美国专利号：4,908,220；4,959,311；5,063,161；5,171,682；5,186,961；以及 5,712,147；Deslys, J. P., "Screening slaughtered cattle for BSE", Nature, Vol.409, pp.476-477,
25 P., 2001 年 1 月 25 日；以及 Cohen, F. E., "Protein Misfolding and Prion Diseases", J. Mol. Biol. (1999), Vol. 293, pp. 313-320。

30

本发明使用蛋白水解酶来降解组织中的感染性朊病毒蛋白，或者，使用蛋白水解酶来消毒或灭菌被朊病毒污染的物品例如外科器

械、刀具和厨房用具、兽医装置以及实验仪器。

5 用本发明的方法降解感染性朊病毒蛋白的效力是出人意料的，因为将感染性朊病毒蛋白单独暴露于高温(例如在 200℃)并没有改变他们的病原性特性；另外，常规的蛋白水解酶例如蛋白酶 K，其彻底消化非感染性 PrP^c，也没有破坏相应的感染性同型异构体。因此，非常惊奇地发现，可以使用低于焚化温度（在此以前该温度是破坏感染性 PrP^{Sc}所需的温度）的温度进行酶处理，以彻底从包含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的组织中除去感染性 PrP^{Sc}。

10

在此使用的术语高温是指温度至少 35℃。术语蛋白水解的敏感性是指将感染性朊病毒蛋白酶降解至非感染性产品的能力。

15 可以用下文描述的各种技术处理位点，例如组织或物品，以减少其中的感染性朊病毒蛋白。

20 例如，在本发明的一个实施方案中，在足够高的温度下将组织或物品(其可能包含感染性朊病毒蛋白、或被感染性朊病毒蛋白污染、或被怀疑包含感染性朊病毒蛋白、或被怀疑被感染性朊病毒蛋白污染)加热足够长的时间，以提高可能存在的感染性朊病毒蛋白的蛋白水解的敏感性，同时将该组织或物品暴露于蛋白水解酶中，使其至少部分有效地破坏存在于其中的任何感染性朊病毒蛋白。

25 这种处理方法可以按两步顺序进行，首先，在较高的高温下加热组织或物品，然后，在较低的高温下将已加热的组织或物品暴露于酶试剂中，以进行感染性朊病毒蛋白的蛋白水解降解。

30 在这种两步处理法中，该组织或物品可以首先在较高的高温下热处理，然后通过例如使所述组织或物品放热、对流或其它合适的方式，将该组织或物品冷却至较低的高温，以便进行第二步酶处理步骤，当

组织或物品用蛋白水解酶接种或暴露于蛋白水解酶中时，该组织或物品处于一个合适的温度下。

5 在这种两步处理法的第二步骤中，将该组织或物品暴露于蛋白水解酶中，以使至少部分有效地破坏组织或物品中的感染性朊病毒蛋白。

10 因此，该方法可以在不同的实施方案中进行，其中，通过将该组织或物品加热至高温，提高该组织或物品中的感染性朊病毒蛋白的蛋白水解敏感性，以进行随后的蛋白水解酶处理。加热步骤中的高温可以是任何合适的温度，例如至少 35°C、至少 40°C、至少 60°C、至少 75°C 和/或不超过 150°C(或其它较低温度，如果需要)，一个说明性的具体温度范围为约 100°C 至约 150°C、更优选约 125°C 至约 140°C。

15 或者，本发明也可以用一步法处理破坏朊病毒蛋白，在这种情况下，在处理过程中的相应温度下，蛋白水解酶是稳定的和有效的，因此不需要最初的加热步骤。

20 在一步法中，动物组织或物品和蛋白水解酶一起被加热至合适的高温，以进行感染性朊病毒蛋白的酶促降解。

25 例如，可以通过加热组织或物品并同时将其暴露于热稳定的蛋白水解酶中，以至少部分降解包含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的组织或物品中的感染性朊病毒蛋白。

30 不管本发明方法中使用的具体顺序，将组织或物品暴露于蛋白水解酶(两步法中的第二步，或一步法的酶促降解步骤)，以至少部分有效地破坏其中的感染性蛋白朊病毒。

本发明的酶促降解步骤可以在任何合适的温度下进行。例如在温

度高于约 35°C、高于约 40°C、或高于约 50°C下进行，这取决于使用的蛋白水解酶的热稳定特性。

5 作为说明性的例子，酶促降解步骤可以在约 35°C至约 100°C、约 40°C至约 100°C、约 50°C至约 100°C、约 40°C至约 75°C、约 50°C至约 60°C的温度范围内进行，这取决于蛋白水解的稳定性以及所使用的具体蛋白水解酶的酶活性。

10 在酶促降解步骤中，蛋白水解酶至少部分、优选完全地破坏要处理的组织或物品中的感染性蛋白朊病毒。

可以理解的是，本发明可以使用任何各式各样的蛋白酶，用于蛋白水解降解的特定蛋白水解酶的选择将影响温度的选择，并影响在暴露于蛋白水解酶之前对组织或物品进行的任何高温处理的选择。

15

酶处理的具体温度条件，以及在酶处理之前的任何高温初步处理步骤必要的或所需的合适温度条件，可以容易地由本领域熟练技术人员确定，而无需经过试验。

20

在本发明中使用的有用的蛋白水解酶包括那些在使用条件下是活性的并且是有效的酶。对于高温酶处理，适合的蛋白水解酶在使用条件下是热稳定的。

25

在这方面，宽范围变化的、具有热稳定特性的蛋白水解酶是已知的。例如，在本发明具体实施方案中使用的各种蛋白水解酶在 35°C、40°C、50°C、60°C、或者甚至在 100°C下还是热稳定的。

30

蛋白水解酶可以是任何合适类型的蛋白水解酶，可以包括单一酶的物种或多种酶的混合物。所述酶可以以纯净的形式和浓缩的形式使用，或者也可以以稀释的形式使用。优选将酶溶于溶剂中，形成浓度

约 0.2g/L 至约 1.0g/L 的酶溶液。

5 本发明中使用的说明性的蛋白水解酶包括但不限于，角蛋白酶、蛋白酶 K、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、凝乳酶、组织蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、弹性蛋白酶、胶原酶、肽链内切酶、肽酶、寡肽酶、嗜热菌蛋白酶、bacillolysin、mycilysins、羧肽酶类、亮氨酸氨基肽酶、氨基肽酶、极热嗜菌蛋白酶、羧基水解酶、木瓜蛋白酶、胰酶、链激酶、链脱酶、无花果蛋白酶、羧肽酶、木瓜凝乳蛋白酶以及菠萝蛋白酶。

10

优选的酶物种包括角蛋白酶。一种特别优选的角蛋白酶包括地衣芽孢杆菌 PWD-1 角蛋白酶。在本发明实践中使用的蛋白水解酶物种包括蛋白水解酶的活性片段，例如角蛋白酶例如地衣芽孢杆菌 PWD-1 角蛋白酶的活性片段。当本发明使用角蛋白酶时，酶溶液需要的有效浓度显著地比常规的酶洗涤剂或消毒剂低。此外，角蛋白酶的特征是在 pH 值从约 6.0 至约 9.5 的范围内，角蛋白酶最佳的活性温度范围从约 50°C 至约 65°C 之间，大大高于那些最常见的酶洗涤剂。因此，本发明方法的净化温度可以显著地提高，其更有效率地提高了手术器械上感染性朊病毒蛋白的蛋白水解敏感性。

15

20 用本发明的方法处理组织时，被处理的组织可以是任何合适类型的组织，包括事实上或潜在地包含感染性朊病毒蛋白的哺乳动物组织、非哺乳动物组织、甚至植物组织。哺乳动物组织可以包括人类以及非人类的哺乳动物组织。

25

在一具体方面，本发明的方法适合处理的组织包括，但不限于，牛组织、羊组织、猴组织和人组织，以及包括不同的组织类型，例如脑、垂体、肠、肺、心脏、肾、和/或脾组织。一方面，本发明的方法被用于处理神经系统组织，其可以是中枢神经系统组织和/或周围神经系统组织。

30

根据本发明，在蛋白水解酶促处理结束之后，从组织或消毒的/杀菌的物品例如外科器械等等中用蛋白水解酶去除感染性朊病毒蛋白的方法，可以进一步包括检验组织或物品以证实其中的感染性朊病毒蛋白被破坏的一个或多个步骤。组织或物品中感染性朊病毒蛋白的检验可以以任何合适的方式以及用任何合适的检验技术或方法进行，例如将该组织或物品进行蛋白质印迹试验、三明治免疫分析试验、ELISA、荧光免疫分析试验、毛细管免疫电泳试验、纤维蛋白溶酶原界限试验或其它合适的试验，上述各种试验可有效的确定在处理的组织中是否存在感染性朊病毒蛋白。

本发明的酶处理方法可以以任何合适的方式进行，用任何合适的处理步骤顺序。

例如，在一个实施方案中，根据需要或要求，将要处理的组织或物品进行最初的非酶热处理，接着进行酶处理以破坏感染性或污染的朊病毒蛋白，接着漂洗和非酶处理，检验已处理的组织或物品；根据需要，如果后处理检验显示没有完全从组织或物品中除去感染性朊病毒蛋白，可以进一步进行热/酶处理(例如以一种交替的和重复循环的非酶热处理以及酶高温处理)。

在另一个实施方案中，通过步骤：在足够高的温度下将组织或物品加热足够长的时间，并同时将其暴露于热稳定的蛋白水解酶中，以至至少部分降解在包含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的组织或物品中的感染性朊病毒蛋白。然后，将已处理的组织或物品进行检验，以确定感染性朊病毒蛋白是否被除去。

另外，在任何热/酶处理之前，本发明的方法可以包括首先测定要处理的组织或物品中是否存在感染性朊病毒蛋白，以便使处理仅仅针对包含感染性朊病毒蛋白的组织或物品。

或者，尽管预先没有明确地确定是否存在感染性朊病毒蛋白，可以对可能潜在地包含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的组织或物品给予热/酶处理，接着检验处理过的产品确定其中是否存在任何感染性朊病毒蛋白。

本发明的方法有效地用于破坏肉和肉类副产品中的感染性朊病毒蛋白，这些肉以及肉类副产品对包含介导 TSEs，例如 BSE 的感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染是敏感的。

因此，本发明提供了一种可靠的处理牛及其它畜牧产品以及副产品的的方法，而不是将其焚化以避免 BSE 及其它感染性朊病毒蛋白疾病的传播，该方法是将所述产品在食品加工和/或加工操作中进行进一步的处理。

因此，在一个实施方案中，本发明提供了一种畜产品和畜副产品的处理方法，其中例如通过加热至一温度，该温度低于感染性朊病毒蛋白的热解破坏温度($\ll 200^{\circ}\text{C}$) (通常在该温度下进行焚化)，将朊病毒蛋白进行非酶热处理，接着酶促降解感染性朊病毒蛋白。

在本发明的一个说明性的具体实施方案中，在约 100°C 至约 150°C 的温度范围内蒸煮牛组织，例如约 5 分钟至约 5 小时，接着在约 35°C 至约 100°C 的温度范围内，将该牛组织暴露于蛋白水解酶中，在该温度范围内蛋白水解酶是热稳定的并且对水解蛋白是有效的，以破坏所述牛组织中的感染性朊病毒蛋白，从而从包含感染性朊病毒蛋白的牛组织中除去感染性朊病毒蛋白。

蒸煮处理可以在一个合适的槽或容器中进行，其中适当地维持高温条件，在蒸煮操作中选择性地控制压力以提供一个理想的大气压、低于大气压、或超大气压。

在蒸煮之后，将牛组织用地衣芽孢杆菌 PWD-1 角蛋白酶进行蛋白水解酶处理，以破坏其中所有的感染性朊病毒蛋白。按照热/酶处理方法，可以以任何合适的方式处理该组织。

5

例如，在检验或测定以证实感染性朊病毒蛋白被完全破坏后，可以将例如牛的组织加工得到动物饲料成分(例如肉骨粉)或饲料添加剂。

10

在一个特别优选的实施方案中，首先在约 125°C 至约 150°C 的高温范围内进行蒸煮，然后在约 40°C 至约 60°C 的高温范围内使用地衣芽孢杆菌 PWD-1 角蛋白酶对牛组织进行酶处理。

15

使用本发明的方法使加工的牛肉类副产品能够利用，否则(怀疑或证实存在感染性朊病毒蛋白)这些牛肉类副产品需要焚化和填埋。

20

因此本发明的方法在本领域中取得了重大的进步，允许将材料作为营养使用，否则没有处理的这些材料将构成生物危害性。本发明的方法同时避免了焚化和填埋被感染的或被污染的动物组织需要的成本和基础设施。

25

本发明具体表现为一种简单的由组织中除去感染性朊病毒蛋白，例如介导 BSE 的朊病毒蛋白的方法，该方法是通过在足够高的温度和足够长的时间下，将所述组织暴露于热稳定的蛋白水解酶中，以至少部分地从所述组织中清除感染性朊病毒蛋白。

30

本发明的方法广泛地适用于破坏朊病毒蛋白，该朊病毒蛋白可引起可传染的海绵状脑病(TSE)和/或其它朊病毒蛋白介导的疾病，包括但不限于，牛海绵状脑病(BSE)和羊瘙痒病。

本发明的方法适于处理人类食物中的动物肉类以及加工动物饲料或动物饲料成分的畜牧副产品。

5 在组合物方面，本发明包括一种组织组合物，其中包括(i)组织，例如牛组织，其包含感染性朊病毒蛋白，例如介导 BSE 的朊病毒蛋白，和(ii)蛋白水解酶，例如地衣芽孢杆菌 PWD-1 角蛋白酶，其在酶处理使用的温度范围内例如从约 40℃至约 60℃是热稳定的。

10 这种组织组合物可以在高温下存在。组合物在合适的高温下是酶活性的，以得到包括蛋白水解酶和无感染性朊病毒蛋白的已处理组织的产品组合物。

15 虽然在上文中，本发明已经说明性地描述了本发明的方法主要应用于处理感染的或污染的收获期的动物组织，例如用于生产动物饲料成分的加工动物部分，本发明同样包括用蛋白水解酶处理体内朊病毒疾病的应用。

20 在一个这样的实施方案中，本发明提供了包括蛋白水解酶作为活性成分的治疗组合物，用于治疗体内朊病毒疾病，该蛋白水解酶能有效地对抗朊病毒疾病。

25 另一个实施方案包括治疗组合物，其包含角蛋白酶和作为体内感染性朊病毒蛋白的分子识别蛋白的非感染性朊病毒蛋白(例如 PrP^c、或改性的 PrP^{Sc} 使其具有相同的非感染性、或非感染性 PrP^{Sc} 片段)的结合。

可以理解的是，其它治疗组合物包括角蛋白酶或其它向量化构造的蛋白水解酶或组合。

30 另一种说明性的治疗组合物包括致热剂，例如无毒改性内毒素类似物，和蛋白水解酶的结合，其能有效地抗击引起体内发热的朊病毒

疾病。

5 本发明同样包括体内治疗组合物，其包括多核苷酸序列，作为重组体多核苷酸表达载体的一部分，该多核苷酸序列包括用于产生蛋白水解酶或其活性片段的第一区域编码以及产生致热肽的第二区域编码。转移感染后，耐热的蛋白水解酶或其活性片段以及致热肽的体内表达具有对抗感染性朊病毒蛋白的作用。

10 作为更进一步的例子，该治疗组合物可以与血脑屏障穿越剂，例如能穿越血脑屏障的两亲药物低聚共轭物配制在一起，用于治疗感染性海绵状脑病。这种组合物可以包括与低聚物共轭的治疗化合物，例如角蛋白酶、其它蛋白水解酶、或它们的活性片段，其中低聚物包括偶合于亲水性部分的亲脂性部分。用于配制这种治疗组合物的低聚物在国际公布 WO00/09073(2000年2月24日公开)有更详细地描述。

15

本发明方法的另一个重要应用是物品，例如外科器械、刀具、厨房用具、实验仪器以及兽医装置的消毒和/或灭菌。这种方法广泛适用于破坏被朊病毒蛋白污染的下述物品：

20 (a) 外科器械，例如钳、镊子、剪刀、刀、电缆、钻孔器、钳子、插管、卡钳、雕刻器、刮匙、刮器、扩张器、夹钳涂药器、收缩装置、收缩器、挖器、针托、吸管、凝固电极、脑电图仪的深度电极、肋骨和胸骨扩张器、双极探针以及肋骨剪等等；

(b) 刀具和厨房用具，例如刀、叉、剪刀、去皮机、削皮刀、切片机、刮铲、以及切肉刀；

25 (c) 实验仪器，例如过滤装置、离心机、分光光度计、荧光光度计和各种容器；和

(d) 兽医装置，例如钳、镊子、刀、锯、探针以及电子击昏设备。

30

上述目录仅仅是本发明几个应用的说明，它不应被认为以任何方

式限制本发明的范围。

下表表示根据本发明的实施方案的消毒/灭菌周期：

表 1

步骤	温度	时间
预洗涤(冷水)	室温	2-5 分钟
加热	35-100°C	20-40 分钟
冷却	34-51°C	2-10 分钟
酶洗涤	34-51°C	20-120 分钟
超声处理	34-51°C	5 分钟
洗涤剂洗涤	51-57°C	2-5 分钟
清洗以及干燥	室温	5 分钟
高压蒸气处理	200-500°C	---

5

在另一实施方案中，将热稳定的蛋白水解酶用于这种消毒/灭菌过程，以便可以同时加热和酶洗涤步骤，在足够高的温度下和足够长的时间内进行消毒/灭菌处理，以完全破坏感染性朊病毒蛋白和对已处理的物品进行灭菌。

10

在组合物方面，本发明包括一种清洗组合物，其包括(i)在酶处理使用温度范围内，例如从约 40°C 至约 60°C 的温度范围内热稳定的蛋白水解酶，例如地衣芽孢杆菌 PWD-1 角蛋白酶；和(ii)溶剂。

15

在本发明的组合物中可以使用适合于酶洗涤剂使用的任何溶剂。考虑到生物的兼容性和低成本，蒸馏水是优选的溶剂。本发明还可以使用其它常规的无机和有机溶剂例如醇、缓冲溶液、洗涤剂溶液，本领域熟练技术人员可以容易地挑选和使用与特定酶相容的溶剂。常见的化学添加剂也可以加入到本发明的清洗组合物中，其包括但不限于，表面活性剂、助洗剂、助促进剂、填料及其它助剂。

20

本发明的清洗组合物甚至在非常低的浓度例如小于 0.3g/L 时仍保持其破坏感染性朊病毒蛋白的有效性。当在所述清洗组合物中使用角蛋白酶时,这种组合物的酶浓度优选在约 0.2g/L 至约 1.0g/L 的范围内。

5 本发明的清洗组合物在高温是酶反应活性的,因此它可以在高温使用以完全破坏外科器械、刀具、厨房用具、兽医装置、和实验仪器上的感染性朊病毒蛋白。

10 通过参考以下说明性的实施例,本发明发明特点和优点将更加充分地显现。

实施例 1

在该实施例中,使用从家禽粪肥的嗜热厌氧消化池中分离得到的降解羽毛细菌,地衣芽孢杆菌株 PWD-1,作为角蛋白酶的来源。(参见 M. Williams 和 J.C. H. Shih, *J. Appl. Bacteriol.*, 67,25 (1989); J. C. H. Shih, *Poultry Sci.* 72,1617 (1993)) (见 X. Lin, C. G. Lee, E. S. Casale, 和 J. C. H. Shih, *Appl. Environ. Microbiol.* 58,3271 (1992))。

20 将该角蛋白酶的基因编码进行分离并测序(参见 X.Lin,D.W. Kelemen, E. S. Miller 和 J.C.H.Shih, *Appl. Env. Microbiol.*, 61,1469 (1995))并进行这种酶的规模发酵生产(参见 J.J.Wang and J. C. H. Shih, *J.Ind. Microb. Biotech.*, 22, 608 (1999))。这种酶是一种丝氨酸蛋白酶。

25 粗制的和提纯的角蛋白酶按以前描述的方法制备(参见 X.Lin,C. G. Lee, E.S. Casale, 和 J. C. H. Shih, *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3271 (1992) and J. J. Wang 和 J. C. H. Shih, *J Ind. Microb. Biotech.* 22,608 (1999))并从 the Fermentation Facility at North Carolina State University, Raleigh, North Carolina (NCSU)获得。角蛋白酶对 PrP 作用试验在 Lelystad (ID-Lelystad), 荷兰的畜牧学和健康学会进行。

30

在与各种底物的反应中，将提纯的角蛋白酶与其它蛋白酶包括弹性蛋白酶、胶原酶、蛋白酶 K 和胰蛋白酶(所有都来自 Sigma 化学公司)进行比较。角蛋白、弹性蛋白、和胶原蛋白的水解用游离氨基增加的茚三酮显色反应(A_{450})进行测定(参见 X.Lin, C. G. Lee, E. S. Casale, 和 J. C. H. Shih, Appl. Environ. Microbiol. 58,3271 (1992))。以游离亮氨酸为标准计算游离氨基的当量。酪蛋白水解用上清液中 A_{280} 的增加进行测定(参见 Price and Johnson,1989)。结果表示在下面的表 1 中。对于每一给定的底物，测定所有蛋白酶的相对活性。累积相对活性(CRA)表明：角蛋白酶具有宽范围的底物和高活性。

10

表 1 蛋白酶作用于不同底物时相对的特异活性^a

底物	角蛋白酶	弹性蛋白酶	胶原酶	蛋白酶 K	胰蛋白酶
角蛋白 ^b	1.00	0.29	0.00	0.36	0.09
弹性蛋白 ^b	2.52	1.00	0.43	0.57	0.61
胶原蛋白 ^b	2.58	1.15	1.00	0.70	0.38
酪蛋白 ^c	1.28	0.80	0.02	1.00	0.40
CRA ^d	7.38	3.24	1.45	2.63	1.48

^a所有的酶活性分别在它们的最佳条件下测定和比较。

^b蛋白水解用茚三酮反应测定(Lin 等人, 1992)。

^c蛋白水解用增加的可溶 A_{280} 测定(Price 和 Johnson 1989)。

15

^d累积相对活性。

角蛋白酶对病原性 PrP 作用的试验在 ID-Lelystad 的分子识别实验室中的一种隔离设备中进行。使用欧盟认证的检验朊病毒的程序 (European Union-Validation Procedure of Prionics Check) (朊病毒 AG, 苏黎士)测定病原性 PrP。朊病毒检验程序基于蛋白质印迹技术并使用 6H4 单克隆抗体以观察特定形式的 PrP[prionsin AG, 牛中 BSE-朊病毒的检验, (Test for Detection of BSE-prionsin Cattle) Practical Product Information, 苏黎士(2000)]。

20

为了模仿肉骨粉加工过程，对原始程序进行修改。首先，用角蛋白酶代替标准方法中的蛋白酶 K。使用粗制的角蛋白酶。其次，检验预先蒸煮的 BSE 组织的作用。用 Vulcain 压力锅在 115℃ 蒸煮均质的组织 40 分钟。第三，检验抗氧化剂，亚硫酸钠(Na_2SO_3)的作用。步骤与 Practical Product Information 相同[prionsin AG, 牛中 BSE-朊病毒的检验, (Test for Detection of BSE-prionsin Cattle) Practical Product Information, 苏黎士(2000)]。

使用下面的方案：将 1g BSE 阳性的脑组织与 9 ml 朊病毒缓冲剂混合并搅匀。分成两份，每份 5ml，其中一份加入 Na_2SO_3 ，最后浓度为 0.1%，另一份没有加入 Na_2SO_3 。分成 4 x 2.0ml，将其分别装入高压福尔肯(Falcon)管中。另外 1.0 ml 用作阳性对照，用标准朊病毒方法处理，另外 1.0 ml 用于没有角蛋白酶的对照。将有和没有 Na_2SO_3 的两个管加压蒸煮 40 分钟，其它两个管不进行蒸煮。将样品，每份 150 μl ，在 PCR 板的孔中，在 50℃ 用角蛋白酶(150 μg ，1,000 EU/mg)处理零-时间或 4 小时。角蛋白酶预先溶于磷酸盐缓冲剂中，0.05M，pH 为 7.5。通过加入 Prionics Pefabloc，一种丝氨酸蛋白酶抑制剂使反应停止。酶培养结束的时候，将每种样品混合物 10 μl 装载到 SDS-PAGE 凝胶上，接着进行朊病毒的电泳、蛋白质印迹、免疫化学发光检测。

该实验的结果表示在图 1 中(角蛋白酶对 BSE 朊病毒蛋白的降解作用)，其中带 1-17 如下：

带 1：只有缓冲溶液。

带 2：试验用 BSE 脑组织。

带 3：用 Na_2SO_3 预先蒸煮，角蛋白酶在零-时间停止。

带 4：和带 3 一样，除角蛋白酶消化 4 小时之外。

带 5：在没有 Na_2SO_3 的情况下预先蒸煮，角蛋白酶在零-时间停止。

带 6：和带 5 一样，除角蛋白酶消化 4 小时之外。

- 带 7 :无预先蒸煮, 用 Na_2SO_3 , 角蛋白酶在零-时间停止。
- 带 8 :和带 7 一样, 除角蛋白酶消化 4 小时之外。
- 带 9 :无预先蒸煮, 无 Na_2SO_3 , 角蛋白酶在零-时间停止。
- 带 10 :和带 9 一样, 除角蛋白酶消化 4 小时之外。
- 5 带 11 :无预先蒸煮, 用 Na_2SO_3 , 没有角蛋白酶。
- 带 12 :和带 11 一样, 除培育 4 小时之外(注:角蛋白酶是随意添加的)。
- 带 13 :提纯的瘙痒病 PrP, 用 Na_2SO_3 , 角蛋白酶在零-时间停止。
- 带 14 :和带 13 一样, 除角蛋白酶消化 4 小时之外。
- 10 带 15 :提纯的瘙痒病 PrP, 用 Na_2SO_3 , 无角蛋白酶。
- 带 16 :和带 15 一样, 除培育 4 小时之外。
- 带 17 : PrP 标准。

如图 1 所示, 角蛋白酶对感染性 PrP 的消化作用是明显的, 特别是当样品在 115°C 预煮 40 分钟(带 3-6)的时候。无预先蒸煮(带 7-10)时, 角蛋白酶的效力较低, 但角蛋白酶仍然降解一半以上的感染性 PrP 阳性材料。在提纯的羊瘙痒病 PrP 上, 发现角蛋白酶同样具有活性(带 13-16)。 Na_2SO_3 单独存在或者与角蛋白酶一起存在看起来没有太多区别(带 15-16)。带 12 的样品是随意添加角蛋白酶的, 因此显示阳性。

20

实施例 2

根据以下实验步骤进行的试验进一步证明本发明的效力。

PWD-1 角蛋白酶,来源于地衣芽孢杆菌菌株 PWD-1 的丝氨酸蛋白酶,被用来降解感染的牛和羊脑干组织中的 PrP^{Sc}。朊病毒的检验(朊病毒 AG, 苏黎士,瑞士)用于测定样品中的 PrP^{Sc}, 按下面步骤检验朊病毒: 预煮组织样品, 用作为消化酶的提纯 PWD-1 角蛋白酶消化组织样品。

30

在每种情况中, 将 1g BSE 阳性脑干组织与 9 ml 朊病毒均化缓冲

剂混合并搅匀，接着在 115℃用 Vulcan 压力锅蒸煮 40 分钟。在 96 孔板中，每个孔中加入 150 μl 样品，用预先溶于磷酸盐缓冲剂的 PWD-1 角蛋白酶(0.05M, pH 为 7.5)处理。使用的酶浓度是 250 μg/ml。在 50℃酶消化 60 分钟。加入 15 μl Pefabloc®，一种丝氨酸蛋白酶抑制剂，
5 停止反应。时间-零样品按如下处理：在加入 PWD-1 角蛋白酶之前，首先加入抑制剂。酶培养结束的时候，将每个样品 10 μl 装载到 SDS-PAGE 凝胶上。用电泳、蛋白质印迹法和免疫化学发光法等在其检测试剂盒中进行检测。

10 用纯净的 PWD-1 角蛋白酶对脑干组织样品，3 BSE 阳性(样品 B1, B2, B3), 1 阴性(牛样品 N), 2 瘙痒病阳性(样品 S1 和 S2)和 1 阴性(羊样品 N)和相应的对照，进行试验。

15 图 2 表示结果，左侧板("角蛋白酶处理")是角蛋白酶消化的结果，右侧板("对照")是标准朊病毒检验的结果。角蛋白酶能水解所有试验的 PrP^{Sc}、BSE(带 3-5)以及瘙痒病(带 8 和 9)。

20 图 2 表明，当这些样品根据本发明用热和酶结合处理时，在包含感染性朊病毒蛋白的牛组织样品(样品 B1、B2、B3)和包含感染性朊病毒蛋白的羊样品(样品 S1 和 S2)中的感染性朊病毒蛋白被完全破坏。

25 结果证明角蛋白酶在降解各种类型试验蛋白中的通用性。在检测角蛋白酶对 BSE PrP 的效力中，特别是当 BSE 脑组织样品预先蒸煮时，结果是肯定的。这是首次用实验证明病原性 PrP 可用酶降解。

30 在将牲畜副产品变成肉骨粉时，在 125 左右加压蒸煮是一种常规的步骤。根据本发明用角蛋白酶进行后-蒸煮处理，用于破坏感染性 PrP，提供了一种有效的方法以控制 BSE 的蔓延。角蛋白酶处理的肉骨粉很容易地被检验证实没有 PrP，因此肉骨粉可以再循环用于饲料。

因此，本发明的方法提供一种简单的和有用的用酶处理畜牧产品和副产品的的方法。

5 虽然本发明已经描述了各种说明性特点、方面和实施方案，应该理解，本发明并不因此受这些限制，对本领域普通熟练技术人员容易理解的是，根据本发明可以扩展到包括其它的变种、修改和其它实施方案。

10 因此，在本发明的精神和范围内，本发明广义地解释为和理解为由包括其它变种、修改、及其它实施方案。

工业的实用性

15 本发明的方法和组合物用于破坏感染性朊病毒蛋白，适用于处理生物材料，例如包含感染性朊病毒蛋白或被感染性朊病毒蛋白污染的动物组织。本发明能够处理生物材料以使其变成有用的和安全的动物饲料或其它营养最终产品，所述生物材料(在怀疑或证实存在感染性朊病毒蛋白)是需要焚化和销毁的。本发明的方法和组合物对物品的消毒和/或灭菌同样有用，例如外科器械、刀具、厨房用具、实验仪器、以及兽医装置的消毒和/或灭菌，并有效地防止由于这些物品的重复使用而引起的感染性朊病毒蛋白的交叉污染和繁殖。

20

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



图1

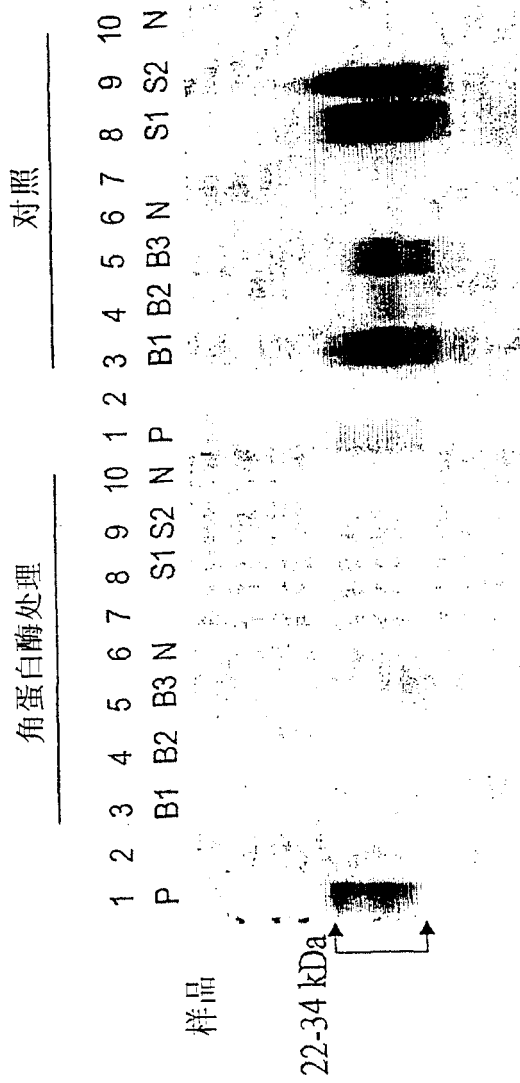


图2

专利名称(译)	破坏感染性朊病毒蛋白的组合物及方法		
公开(公告)号	CN1516740A	公开(公告)日	2004-07-28
申请号	CN02808204.4	申请日	2002-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	百瑞国际公司		
申请(专利权)人(译)	百瑞国际公司		
当前申请(专利权)人(译)	百瑞国际公司		
[标]发明人	石家兴		
发明人	石家兴		
IPC分类号	G01N33/53 A61L2/00 A61L2/04 A61L2/16 C11D3/386 C11D7/42 C12Q1/00		
CPC分类号	A61L2/04 A61L2/0082 A61L2/16 A61L2/0023		
代理人(译)	王维玉		
优先权	09/834284 2001-04-12 US 10/007613 2001-10-26 US		
其他公开文献	CN1308460C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种破坏感染性朊病毒蛋白的方法和组合物，该朊病毒蛋白与传染性海绵状脑病(TSE)和/或其它由朊病毒蛋白引起的疾病有关，通过用破坏朊病毒的蛋白酶进行热/酶处理感染性朊病毒蛋白。该方法和组合物用于处理含感染性朊病毒或被感染性朊病毒蛋白菌株污染的组织，或者用于对朊病毒污染的物品，例如外科器械、厨房用具、实验仪器等的消毒或杀菌。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

