

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

C07C211/00

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98806894.X

[43]公开日 2000年8月2日

[11]公开号 CN 1261873A

[22]申请日 1998.5.13 [21]申请号 98806894.X

[30]优先权

[32]1997.5.13 [33]US [31]08/855,378

[86]国际申请 PCT/US98/09724 1998.5.13

[87]国际公布 WO98/51660 英 1998.11.19

[85]进入国家阶段日期 2000.1.4

[71]申请人 戊糖药品公司

地址 美国马萨诸塞州

[72]发明人 E·I·布多夫斯基

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 杨九昌

权利要求书 2 页 说明书 33 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 选择性修饰核酸的方法及组合物

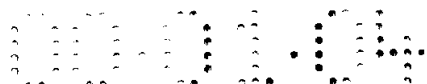
[57]摘要

本发明提供了下面的方式和方法:通过将包含细胞或生物聚合物的组合物接触 选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂,灭活这样的组合物中的病毒和其它生物,而不会显著改变蛋白或其它生物聚合物。

ISSN 1008-4274

## 权利要求书

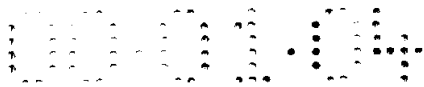
1. 灭活生物组合物中的病毒的方法,包括在病毒灭活条件下将所述组合物与具有式 $\beta\text{-Hal}-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH})_n\text{H}$ 的选择性灭活剂接触,其中n是2到5之间的整数,包括2和5。
2. 权利要求1的方法,其中n是2或3。
3. 权利要求1的方法,其中所述生物组合物是包含细胞的组合物。
4. 权利要求1的方法,其中所述生物组合物选自:哺乳动物的全血、纯化或部分纯化的血蛋白、血细胞蛋白、乳、唾液、血浆、血小板富集的血浆、血浆浓缩物、由所述血浆的任何分级组分得到的沉淀、由所述血浆的任何分级组分离得到的上清液、血清、冷沉淀物、冷上清液、细胞裂解物、哺乳动物细胞培养物、哺乳动物细胞培养基、胎盘提取物、发酵产物以及在血细胞中诱导得到的蛋白。
5. 权利要求1的方法,其中所述生物组合物是哺乳动物的全血。
6. 权利要求1的方法,其中所述生物组合物是血浆。
7. 权利要求1的方法,其中所述生物组合物包含由以下选出的蛋白:血纤蛋白原、因子VII、因子VIII、因子IX、因子X、免疫球蛋白、前白蛋白、视黄醇结合蛋白、白蛋白、 $\alpha$ -球蛋白、 $\gamma$ -球蛋白、补体成分、纤连蛋白、抗凝血酶III、血红蛋白、干扰素、生长因子、纤溶酶原激活物、生长激素、胰岛素和促红细胞生成素。
8. 权利要求7的方法,其中所述蛋白是一种人类蛋白。
9. 权利要求1的方法,其中所述病毒是一种有包膜病毒。
10. 权利要求1的方法,其中所述病毒是一种无包膜病毒。
11. 具有式 $\beta\text{-Hal}-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH})_n\text{H}$ 的化合物,其中n是2到5之间的整数,包括2和5。
12. 权利要求11的方法,其中n是2或3。



13. 具有式  $[\text{Br-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2]$   
 $\cdot(\text{HBr})_3$ 的化合物。

14. 具有式  $[\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2]$   
 $\cdot(\text{HCl})_3$ 的化合物。

5



# 说明书

## 选择性修饰核酸的方法及组合物

### 发明背景

5

本发明涉及选择性灭活在生物组合物中的病毒的方法及组合物。

10

通过血液或血液制品的传播病毒病(如甲型肝炎和乙型肝炎、获得性免疫缺陷综合征、巨细胞病毒感染)是医学方面的一个重大问题。虽然供体选择标准和筛选供体血液中的病毒标记有助于减少病毒到受体的传播,但这些筛选方法是不完全的或低于100%灵敏度,因为大部分筛选方法仅针对少数个别病毒。甚至在这样的情况下,它们的灵敏度也是不够的。此外,其它生物组合物,如哺乳动物细胞系和杂交瘤细胞系、细胞系的产品、乳、初乳和精液,也可能含有传染性病毒。

15

理想的是灭活供体血液、血液制品或其它生物组合物中含有的任何病毒。同时,重要的是使得有价值的组分的结构和功能相对地不被改变,其中所述有价值的组分是如红细胞、血小板、白细胞和血浆生物聚合物,如蛋白质和多糖。

20

为人类或兽医用途生产最大限度安全和有效的灭活疫苗,需要完全而可靠地使活微生物(如病毒和细菌)不具有感染性(“灭活”)、但对它们的免疫原性有最小影响的方法。一般用于灭活病毒的方法,如那些在制备病毒疫苗中使用的方法,通常改变或破坏了细胞、细胞成分、蛋白质和其它抗原的功能和结构。

25

目前的灭活方法包括用福尔马林、 $\beta$ -丙酸内酯或紫外辐射灭活病毒。此外,乙烯亚胺单体已经用于灭活口蹄疫病毒(SU 1915956)、支原体属(*Mycoplasma*)和无胆甾原体属(*Acholeplasma*)(WO 92/18161)和鸟类的感染(RO 101400);二乙烯亚胺(即由两个底物化合产生的乙烯



亚胺单体)已经用于灭活猫肠冠状病毒FECV (EP 94200383); 而聚乙烯亚胺已经用来作为植物病毒的防治剂(JP 7882735)。

5 这些试剂和方法非特异性地修饰微生物, 如病毒和细菌, 因此难于标准化以及可重现地应用。此外, 化学改变使得微生物不具有感染性, 对这一点的忽视可能使这个过程难于可重现地应用。其结果是由于不充分灭活或灭活后回复导致的疾病周期性爆发。由于这个问题, 已经发生了麻痹性脊髓灰质炎、口蹄疫和委内瑞拉马脑炎的大爆发。

10 一般说来, 微生物的多种成分, 包括重要的表面抗原决定簇如病毒壳体蛋白, 受到目前使用的灭活剂的影响。这些试剂不仅显著修饰核酸, 而且显著修饰其它生物聚合物, 如蛋白、糖类和脂质, 因此损害它们的功能。抗原被改变或保护性表位的灭活可能导致免疫原性降低并进而导致效力降低(如灭活脊髓灰质炎疫苗), 或导致抗原性改变并进而导致疾病的免疫刺激而不是疾病预防(如用福尔马林灭活产生的呼吸道合胞病毒疫苗或灭活麻疹疫苗), 或导致新抗原的出现, 15 这些新抗原与其它用同样的灭活剂制备的灭活疫苗的抗原相同。

20 由于所需的生物聚合物如蛋白、糖类和脂蛋白在血浆中共存, 因此灭活生物混合物中的病毒的问题与单独灭活病毒的问题不同。虽然有可能通过使用如甲醛或氧化剂等试剂来灭活一些病毒, 但由于观察到这些灭活剂中的大部分都损害血浆中生物聚合物或血液的细胞成分的生物活性, 因此这些方法不适于灭活血液中的病毒。例如, 已经显示使用紫外线能灭活血小板浓缩物中的病毒。然而, 在高剂量下导致严重的血小板损害。 $\beta$ -丙酸内酯与核酸和蛋白质以相似速率反应; 因此, 在病毒被灭活的同时, 损失了显著量的血浆因子VIII活性。

25 再一个问题是, 一些污染血液或其它生物流体的病毒包含在细胞之内, 或是作为完全形成的病毒、病毒基因组片段, 或是作为整合进宿主基因组的病毒核酸。例如, HIV病毒包含在白细胞之内。灭活无细胞形式的病毒以及包含在细胞内形式的病毒、同时保存细胞的结



构完整性，这是一个特别关注的问题。在从非血液来源获取有价值的生物聚合物方面也存在问题，因为致病病毒也可能污染这样的组合物。

5

### 发明简述

本发明描述了一种灭活生物组合物中的病毒的方法的特征，所述方法在病毒灭活条件下使所述组合物接触式 $\beta$ -Hal-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH)<sub>n</sub>H的选择性的灭活剂，其中n是2到5之间的整数，包括2和5。n最好是2或3。

10

所述生物组合物最好是包含细胞的组合物。所述生物组合物最好从以下选出：哺乳动物的全血、纯化或部分纯化的血蛋白、血细胞蛋白、乳、唾液、血浆、富含血小板的血浆、血浆浓缩物、由所述血浆的任何分级组分得到的沉淀、由所述血浆的任何分级组分得到的上清液、冷沉淀物、冷上清液、细胞裂解物、哺乳动物细胞培养物或培养基、胎盘提取物、发酵产物以及血细胞中被诱导的蛋白。例如，所述生物组合物可以是哺乳动物的全血或血浆。

15

所述生物组合物最好包含由以下选出的蛋白：血纤蛋白原、因子VII、因子VIII、因子IX、因子X、免疫球蛋白、前白蛋白、视黄醇结合蛋白、清蛋白、 $\alpha$ -球蛋白、 $\gamma$ -球蛋白、补体成分、纤连蛋白、抗凝血酶III、血红蛋白、干扰素、生长因子、纤溶酶原激活物、生长激素、胰岛素和促红细胞生成素。所述蛋白最好是人类蛋白。所述病毒可以是有包膜或无包膜的病毒。

20

本发明还描述了具有式 $\beta$ -Hal-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH)<sub>n</sub>H的化合物的特征，其中n是2到5之间的整数，包括2和5。n最好是2或3。本发明还描述了具有结构式[Br-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>] $\cdot$ (HBr)<sub>3</sub>的化合物以及具有式[Cl-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>] $\cdot$ (HCl)<sub>3</sub>的化合物的特征。

25



### 附图简述

图1. 乙烯亚胺寡聚物灭活剂的单体(I)、二聚物(II)、三聚物(III)、直链和支链四聚物(分别是IV和V)的结构。

图2. 乙烯亚胺及其寡聚物的电位滴定曲线。罗马数字对应于图1所示的结构。

图3. 在0.15M NaCl, pH 7.5, 20°C中的乙烯亚胺(0.025M, 曲线1)、乙烯亚胺二聚物(0.007M, 曲线2)、乙烯亚胺三聚物(0.003M, 曲线3)以及乙烯亚胺直链和支链四聚物的等摩尔混合物(0.0015M, 曲线4)作用下噬菌体MS2的存活曲线。

图4. 在先技术示意图, 显示在0.15M NaCl (20°C)中的0.007M乙烯亚胺二聚物作用下于pH 6.5、6.9、7.5和8.5的噬菌体MS2的存活曲线(分别是曲线1、2、3和4)。

### 优选实施方案的描述

#### 1. 定义:

“选择性灭活剂”是指乙烯亚胺寡聚物试剂, 所述乙烯亚胺寡聚物试剂具有一个氮丙啶基(aziridino)或 $\beta$ -卤代-乙胺部分, 并且对聚阴离子(如多核苷酸)的专一性亲和力超过对其它生物分子的专一性亲和力。本发明的选择性灭活剂包含一类相对低毒性的化合物, 所述化合物在灭活条件下使用时, 选择性地结合于包含病毒遗传物质的核酸(单链DNA、双链DNA、或RNA), 并且不可逆地修饰功能性核酸, 使所述病毒灭活。

按照本发明的“乙烯亚胺寡聚物”是指乙烯亚胺的寡聚物, 所述寡聚物具有一个末端氮丙啶基并且可以可任选地发生取代。本发明优选的乙烯亚胺寡聚物具有至少三个乙烯亚胺单位, 并且包括例如三聚物或直链或支链的四聚物。有代表性的乙烯亚胺寡聚物如图1所示。在本发明的方法中, 优选有少于十个单位的乙烯亚胺寡聚物, 更优选有大约三个或四个单位的乙烯亚胺寡聚物。



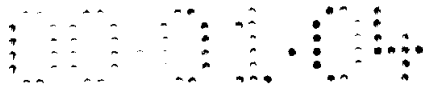
乙烯亚胺寡聚物也可以被取代，只要这种取代并不去除乙烯亚胺的基本特性。在一个实施方案中，乙烯亚胺寡聚物被卤素取代，并具有通式 $\beta\text{-Hal}-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH})_n\text{H}$ 。“n”最好是2到5之间的整数，包括2和5。这样的化合物通常被称为氮芥，其合成是用氯化氢或溴化氢将乙烯亚胺或其寡聚物定量转化成 $\beta$ -卤代单乙胺或 $\beta$ -卤代寡聚乙胺。这些合成方法将在下文更详细地描述。氮芥是强亲电子试剂，它们或是直接地、或是通过中间转化为相应的氮丙啶来烷基化核酸碱基(nucleic base)的亲核基团。作为乙烯亚胺寡聚物， $\beta$ -卤代-寡聚乙胺对聚阴离子具有高亲和力。因此，这些乙烯亚胺寡聚物对核酸具有高选择性；然而，修饰的动力学需要调节。

如果一种灭活剂与核酸反应的比较速率(comparative rate)比它与其它生物分子(如蛋白、糖类或脂类)的反应速率更快，则所述灭活剂就对核酸具有“选择性”或“选择性地”与核酸反应。鉴于乙烯亚胺单体与其它烷化剂对核酸有大致相同的选择性，乙烯亚胺寡聚物灭活剂对核酸的选择性水平超过对蛋白质的选择性水平是不曾预料到的。

“核酸”指单链和双链的DNA以及单链和双链的RNA。

“生物组合物”是指包含细胞或生物聚合物的组合物。包含细胞的组合物包括，例如，全血、红细胞浓缩物、血小板浓缩物、白细胞浓缩物、血细胞蛋白、血浆蛋白组分、纯化的血蛋白、血清、精液、哺乳动物的初乳和乳、胎盘提取物、发酵产物、腹水和在细胞培养物中由普通细胞或转化细胞(如通过重组DNA技术或单克隆抗体技术)产生的产物。“生物聚合物”或“生物分子”是指通常在活的生物体中发现的任何种类的有机分子，包括如，核酸、多肽、翻译后修饰过的蛋白(如糖蛋白)、多糖和脂质。包含生物聚合物的组合物包括，例如，血细胞蛋白、血浆、血浆分级分离沉淀、血浆分级分离上清液、冷沉淀物、冷上清液或它们的部分或衍生物、血清或由普通细胞或转化细胞(如通过重组DNA技术或单克隆抗体技术)产生的非血液制品。生物组合物可以是无细胞的。





“功能性核酸”是指这样的核酸，它具有在复制、转录、翻译或核酸分子的其它活性中作为模板的序列元件。这样的元件包括，例如，编码核酸分子的复制起点的序列、转录元件如启动子/增强子、转录终止子和其它调节元件；翻译元件如核糖体结合位点、翻译起始密码子、编码序列以及同相终止密码子；以及赋予RNA催化活性的序列。

“抑制生物聚合物的活性”是指可衡量地降低所述生物聚合物的功能或活性。采用任何用于测量该特定的生物组合物活性的标准测定，可以确定功能或活性的降低。例如，要确定对酶(蛋白)或抗原活性的抑制，可以采用常规的测定，测量酶促过程速率的改变或对抗原的免疫应答的改变。

“使灭活的”、“灭活”或“使灭活”在指功能性核酸时是指，通过例如，破坏复制、转录或翻译信息的能力基本去除DNA或RNA的活性。例如，可以在合适的体内或体外翻译系统中测量产生的由确定量RNA编码的蛋白的量，确定对RNA翻译的抑制。在指病毒时，这个术语是指减少或消除感染性病毒颗粒的数目，在测量上表现为感染性滴度的降低或每毫升感染性病毒颗粒数目的减少。采用一般技术人员所熟知的测定方法，确定这样的感染性病毒颗粒的减少，这些测定方法如那些在Lennette, E. H.和Schmidt, N. J. (编辑)(1985) *Diagnostics Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 第62版, American Publisher's Assn., Washington, D. C.。

“病毒灭活条件”是指这样的条件，在此条件下将病毒颗粒与本发明的选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂温育，以便灭活病毒基因组至所需程度，所述条件包括处理时间、pH、温度、盐组成以及选择性灭活剂的浓度。从下文所述的条件选出病毒灭活条件以选择性修饰核酸。

“病毒”是指DNA病毒和RNA病毒。病毒包括有包膜或无包膜的病毒，例如，痘病毒、疱疹病毒、腺病毒、乳多空病毒、细小病毒



呼肠病毒、环状病毒、细小核糖核酸病毒、轮状病毒、甲病毒、风疹病毒、A型和B型流感病毒、黄病毒、冠状病毒、副粘病毒、麻疹病毒、肺病毒、弹状病毒、狂犬病毒、正粘病毒、本杨病毒、白蛉病毒、纳伊罗病毒、嗜肝DNA病毒、沙粒病毒、反转录病毒、肠道病毒、鼻病毒以及线状病毒。

“疫苗”以其通常意义使用，指有效赋予生物必需程度的免疫、同时仅导致极低水平的发病率或死亡率的因子。制造疫苗的方法当然可用于研究免疫系统以及预防动物或人类疾病。

“药学上可接受的”是指所述化合物对其所给予的动物是相对无毒的。“药学上可接受的载体”包括任何标准药用载体、缓冲液和赋形剂，以及各种类型的润湿剂和/或辅助剂，其中所述缓冲液和赋形剂如磷酸缓冲盐溶液、水和乳剂(如油/水乳剂或水/油乳剂)。

## 2. 一般描述

本发明是基于这样的意外和惊人的发现：与许多修饰核酸的试剂、特别是乙烯亚胺单体(氮丙啶)相比，乙烯亚胺寡聚物(如三聚体或四聚体形式)对核酸的修饰比对其它生物聚合物(如蛋白)的修饰有显著更高的选择性。乙烯亚胺寡聚物的选择性比乙烯亚胺单体高许多个数量级，在一些情况下要高六个数量级。在本发明的方法中，使用选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂对包含与蛋白紧密结合的核酸(如核蛋白)的组合物特别有效。

乙烯亚胺寡聚物灭活剂能有效并且专一性地灭活生物组合物中的病毒，其中所述生物组合物如包含细胞或包含生物聚合物的组合物。本发明提供了在混合的生物聚合物的组合物中，选择性修饰病毒或其它微生物的核酸分子的方法。

已经发现，当包含生物聚合物的组合物与乙烯亚胺寡聚物灭活剂接触足够长的时间时，该组合物中存在的病毒被灭活至所需程度(测量病毒灭活时至少约6 log，计算时至少约20 log)，而不会对组合



物所包含的生物聚合物(如蛋白)造成显著损害,其中所述组合物如血  
细胞蛋白、血细胞衍生物(如血红蛋白、 $\alpha$ 干扰素、人类生长激素、促  
红细胞生成素、PDGF、tPA等等)、血浆、血浆分级分离沉淀、血浆  
5 分级分离上清液、冷沉淀物、冷上清液或上述组合物的部分或衍生  
物、血清或由普通细胞或转化细胞(如通过重组DNA技术)产生的非血  
液制品。通过血蛋白混合物或浓缩物与乙烯亚胺寡聚物灭活剂接触,  
可以将病毒(如甲型肝炎病毒或乙型肝炎病毒或HIV)灭活至所需程  
度,如至可测量的灭活程度大于至少约6 log,或在计算上至少约20个  
10 数量级。通过感染力滴定确定组合物中的病毒数量。受处理的组合物  
中的生物聚合物,如蛋白、糖类和脂质,基本保留灭活前的水平全部  
活性。

本发明的方法已经就处理血浆、血浆组分、血浆浓缩物或它们的  
成分而描述。然而,该方法也可用于处理溶胞产物或由细胞分泌的  
蛋白。同时还考虑处理由血小板、白细胞、红细胞、成纤维细胞得到  
15 的组分,以及干扰素、生长激素、tPA、因子VII、转移因子、血红蛋  
白、生长因子、EPO和DNA酶的溶液。

还考虑了使用本发明的灭活剂和方法,可以处理新鲜的冷冻血  
浆、解冻的冷冻血浆、冷沉淀物、冷上清液或冷冻血浆的得到的浓缩  
物,以及它们的稀释产物。

通过本文所述的同一个方法,可以灭活正常细胞或转化细胞的  
产物中存在的病毒,同时保留这样的产物中生物聚合物的活性。例  
如,使用乙烯亚胺寡聚物灭活剂,可以灭活使用正常细胞或转化细胞  
产生的产物、正常细胞或转化细胞的溢泌物、通过遗传工程产生的杂  
交瘤和产物。这样的处理基本上并不会不利地影响所需的生物聚合  
25 物,如特定的蛋白。用于产生所需蛋白的细胞当然可以是哺乳动物细  
胞,也可以是非哺乳动物细胞。

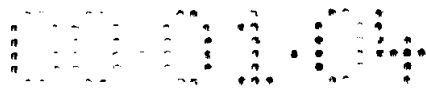
本发明的方法和组合物基本上灭活样品中含有的所有病毒。确  
定感染力水平的方法是本领域的一般技术人员所熟知的。根据本发

明，获得实验可测的病毒灭活的程度至少约“6 log” ( $6.0 \log_{10}$ )。也就是说，当病毒在未处理样品中存在的浓度使得即使稀释 $10^6$ 倍后，仍可检测到病毒感染力时，在处理过的样品中，根据感染力研究确定，病毒被完全灭活到这样一个程度，以致处理后在未稀释材料中检测不到病毒。更重要的是，由于已经获得了如本文所述的灭活过程的精确动力学描述，可以获得含病毒组合物的感染力在计算上降低至少约20个数量级，或“20 log”。

本发明提供了在包含细胞或生物聚合物的组合物中，选择性氨基烷基化核酸分子的方法与条件，包括将所述组合物与乙烯亚胺寡聚物灭活剂接触。这个过程的结果是组合物中的核酸分子被化学修饰，其反应速率比其它生物分子的反应速率要快得多。所述方法可用于专业人员希望修饰核酸、但保持其它生物分子相对不被改变的任何过程中。例如，本发明的方法可用于用带有可检测标记(放射性标记、荧光标记、酶标记等等)的乙烯亚胺寡聚物在核蛋白(如染色质或核糖体)中优先标记核酸，这可用于如作图或灭活病毒或其它生活微生物的基因组。

本发明的乙烯亚胺寡聚物灭活剂优先通过质子化氮丙啶基与多核苷酸中的核酸碱基反应，从而修饰核酸。病毒灭活剂结合聚阴离子的能力，部分取决于每分子可质子化基团的数目以及在给定条件下质子化的总水平。通过寡阳离子病毒灭活剂与核酸聚阴离子的结合发生修饰。质子化的程度部分取决于pH。如本文所述，氮丙啶基的 $pK_a$ 随聚合物长度而降低。然而，乙烯亚胺寡聚物灭活剂选择性结合核酸的能力随乙烯亚胺寡聚物灭活剂长度而显著增加。因此，专业人员可以在生理pH下有效并选择性地烷基化核酸。

在某些实施方案中，所述乙烯亚胺寡聚物灭活剂是三聚物、直链四聚物或支链四聚物。灭活生物组合物中的病毒的优选灭活条件包括，将所述组合物与约0.0001M到约0.010M乙烯亚胺寡聚物灭活剂温育，pH为约pH 6.9到约pH 8.5，溶液离子强度为约0.01M到约0.5M。



更优选的反应条件包括，将所述组合物与约0.001M到约0.01M乙烯亚胺寡聚物灭活剂温育，pH为约pH 6.9到约pH 8.5，溶液离子强度为约0.1M到低于约0.5M。优选的灭活条件包括，在约4℃到30℃范围内的温度下，使所述包含细胞或生物聚合物的组合物与乙烯亚胺寡聚物灭活剂(如三聚物、直链四聚物或支链四聚物)接触。

选择性氨基烷基化核酸的优选条件包括将所述核酸与约0.0001M到约0.015M选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂接触的步骤，其中pH是约pH 6.5到约pH 8.5，优选pH 7.0到约pH 8.0，最优选约pH 7.5。乙烯亚胺寡聚物灭活剂的浓度部分取决于所述乙烯亚胺寡聚物灭活剂中可质子化基团的数目，而pH的选择取决于病毒体的稳定性。所述乙烯亚胺寡聚物灭活剂最好是乙烯亚胺三聚物、直链四聚物或支链四聚物。更优选的条件包括使核酸在溶液中接触或暴露于选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂，其中所述溶液的离子强度是约0.1M到约0.5M，最好是0.15M。盐可以是那些生物化学中通常使用的盐中的任何一种，包括钠盐、钾盐、磷酸盐或乙酸盐等等。专业人员可以使用本领域内通常用于处理生物聚合物或细胞的多种缓冲液调整溶液的pH，其中所述缓冲液如乙酸盐、Tris、HEPES、MOPS等等。MOPS和Tris是优选的缓冲液。缓冲液中的高浓度磷酸盐是不利的。专业人员可以调整反应条件以获得所需的pH和离子强度。专业人员也可以调节其它因素，如反应物浓度、温度和温育时间，这取决于反应条件和所需的感染性灭活的程度。如下文所述，使用动力学方法，应该可以确定灭活反应的终点，还可以从上述氨基烷基化核酸的条件中确定灭活功能性核酸或病毒至预定程度的条件。

使用本领域内的一般技术人员已知的各种测定方法，专业人员可以通过病毒感染性灭活的程度确定病毒核酸烷基化的程度，所述测定方法如测定在组织培养物中的致细胞病变效应(CPE)，方法是将连续稀释的包含病毒的混合物导入易感细胞，然后在37℃温育。乙烯亚胺寡聚物对蛋白、多糖和糖蛋白的修饰会导致引入额外的正电荷。可



以用本领域内已知的方法测定生物聚合物修饰的程度，包括例如，的等电聚焦、聚丙烯酰胺凝胶、HPLC和其它形式的层析方法以及用放射自显影检测或合适方法的检测。

5 本发明还涉及在包含细胞或生物聚合物的组合物中选择性修饰核酸、氨基烷基化核酸的组合物，所述组合物中包含约0.0001M到约0.015M 乙烯亚胺寡聚物灭活剂；离子强度为约0.1M到0.2M，最好是约0.15M；缓冲于约pH 6.5到约pH 8.5，优选约pH 7.0到约pH 8.0，最优选约pH 7.5。所述乙烯亚胺寡聚物最好是三聚物或直链或支链四聚物。盐和缓冲液可以是上述的任何一种。在一个实施方案中，所述组  
10 合物的乙烯亚胺寡聚物的量、离子强度和pH有效氨基烷基化核酸。在另一个实施方案中，所述组合物的乙烯亚胺寡聚物的浓度、离子强度和pH有效灭活病毒。这些组合物可用作消毒剂或杀病毒剂，并可用于本文所述的本发明的所有方法。

15 本发明还涉及在生物样品中选择性抑制功能性核酸的活性的方法，包括将所述样品与有效量的乙烯亚胺寡聚物灭活剂接触。这些方法有许多用途。当所述功能性核酸是裸露核酸，如质粒或DNA区段时，抑制可用于降低所述分子通过如转染转化细胞并掺入的能力。在无细胞翻译系统中，抑制可用于降低RNA的翻译。当所述功能性核酸是催化性核酸如核酶时，所述方法可用于抑制所述核酸对其靶的作用。  
20

当所述功能性核酸是病毒基因组，即感染性病毒的一部分时，所述方法可用于消毒一个区域，灭活或消除包含细胞或生物聚合物的组合物中的病毒，以及灭活病毒的感染性至所需程度(如通过计算至少为20 log，如本文所述)，其中所述组合物如全血、血液制品或生物  
25 制品，如细胞培养物中产生的蛋白。所述包含生物聚合物的组合物可以包括例如，从全血纯化的蛋白；血液制品(如，凝血因子如因子VIII，激素如促红细胞生成素等等)；细胞培养物的产物，如细胞提取物、富含生物分子(如重组蛋白)的生长培养基；用血液制品和植物产



物加工的包含蛋白的组合物(如与小牛血清温育过的组合物)。这些方法可用于帮助保证这些制品的纯度和安全性，以在实验室中或在治疗中使用，同时保留组合物中的生物制品的关键生物特性。

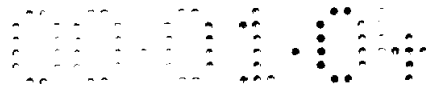
5 相似地，如果所述功能性核酸是细菌的核酸或另一种生物基因组的一部分，则这些方法可用于消毒或去除这样的细菌或其它生物。

使用本发明的方法修饰病毒基因组阻止了病毒繁殖，并因此消除了本发明的灭活疫苗的感染性。此外，由于病毒体外被蛋白并不被修饰至同样程度，所以疫苗保持了显著的免疫原性。因为与其它选择性灭活剂相比，乙烯亚胺寡聚物对核酸的修饰有显著更高的选择性，所以本发明的包含乙烯亚胺寡聚物的组合物与其它目前使用的选择性较  
10 低的灭活剂相比，提供了显著的好处。

因此，本发明也涉及制备灭活疫苗的方法，包括在病毒灭活条件下用选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂接触病毒。病毒灭活条件由上面所述的氨基烷基化和灭活病毒核酸、细菌核酸或其它核酸的方法中  
15 选出。通常，将滴度为约 $10^7$ 到 $10^8$ 单位每毫升的病毒与乙烯亚胺寡聚物温育；pH为约pH 6.5到约pH 8.5，溶液离子强度约小于0.50M，温度约 $4^{\circ}\text{C}$ 到约 $40^{\circ}\text{C}$ 。处理时间(即灭活终点)取决于具体病毒的结构和组成、温育温度、离子强度以及所述乙烯亚胺寡聚物中可质子化基团的数目。然而，动力学研究表明：根据pH以及要灭活的病毒，温育时间可以短至几秒钟，也可以是约1小时、5小时、50小时、100小时、  
20 300小时或500小时。所述选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂最好是三聚物、直链四聚物或支链四聚物。制备疫苗的方法在本领域内是众所周知的，并可以在如*Vaccines* (Slorein, G. Martance, E.编辑) 第二版1994, Saunders Harcourt-Brace, Phil, Toronto中找到。

25 对于疫苗用途，所述灭活疫苗可以直接在疫苗制剂中使用，或在单剂量或多剂量容器中冻干以进一步与药学上可接受的载体混合。冻干的灭活疫苗通常保存于 $4^{\circ}\text{C}$ 。

所述疫苗也可以在一种佐剂中给予，佐剂是一种在与抗原联合



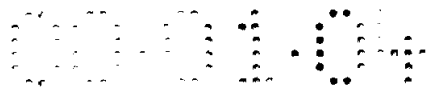
使用时强化免疫应答的物质。所述疫苗可以以免疫剂量给予，免疫剂量是产生或增强免疫应答所需的抗原或免疫原的量。这个量会因不同佐剂的存在和有效性而异。这个量会因动物以及免疫原或抗原或佐剂而异，但通常会少于约100mg每剂。免疫剂量容易地用本领域内的技术人员所熟知的方法确定，如统计学上进行有效的宿主动物免疫和功  
5 击研究。参见如 *Manual of Clinical Immunology*, H. R. Rose 和 H. Friedman, American Society for Microbiology, Washington, D. C. (1980)。

处理包含细胞或生物聚合物的组合物或制备灭活疫苗的方法在  
10 灭活病毒中特别有用，其中所述病毒在本领域内已知可用其它烷化剂(如乙烯亚胺单体和 $\beta$ -丙酸内酯)不可逆地灭活。因此，虽然本发明的所述试剂由于它们的选择性具有更广泛的用途，但在选择用于制备疫苗的病毒或要去污染的生物制品时，专业人员部分要根据本领域内使用其它灭活剂的经验来指导。

本发明也涉及包含有效量的灭活病毒以及一种药学上可接受的  
15 载体的灭活疫苗，其中所述灭活病毒通过下述过程制备：在有效消除感染性至所需程度(直到根据直接测量至少约6 log或根据计算至少20 log，如本文所述)的灭活病毒的条件下处理病毒。本发明的疫苗可用于预防动物或人类疾病。能够赋予所需程度的免疫性的疫苗当然会包含诱发免疫应答的有效量的灭活病毒。与其它疫苗相比，这些疫苗中的  
20 的病毒基因组在核酸碱基的内环氮上被烷基化，但本质上不同的是，因为与对病毒体中其它生物聚合物的修饰相比，对核酸修饰的相对速率比用任何其它选择性灭活剂所能获得的都要显著大得多，所以这种灭活更有效。在制备灭活疫苗时，病毒样品与本发明的选择性灭活剂  
25 温育，灭活剂的量和所用的条件能灭活病毒同时保留免疫原性。

合适的药用载体和它们的配制在Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第十九版(Mack Publishing Co., Easton 1995) 中描述。这样的组合物通常包含有效量的所述化合物以及适量载体，





以便为恰当给予受治疗者制备合适的剂型。

本发明还涉及治疗方法，即通过给予受治疗者本发明的灭活疫苗使受治疗者对病毒免疫。受治疗者可以是人类或人类以外的动物。在本发明的治疗方法的实施中，通过本领域内任何常用并且可接受的方法，将有效量的如上所述的本发明化合物或是单独给予、或是与本发明的另一种化合物组合给予。

在本发明的治疗方法的实施中，给予受治疗者的疫苗的具体剂量取决于多种考虑，包括病毒的性质、给药方案、受治疗者的年龄和身体特征等等。使用医药技术领域内熟悉的临床方法，可以建立合适的剂量。

本发明还提供了采血装置，该装置包含用于接受血液或血液组分的容器，容器中盛有乙烯亚胺寡聚物灭活剂，灭活剂的量能有效灭活装进容器的血液或血液组分中的病毒。

本发明的另一个实施方案涉及包含病毒的诊断试剂和诊断标本，所述诊断试剂和诊断标本已经在灭活条件下用本发明的病毒灭活剂处理。

虽然不希望受到理论的束缚，但选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂对核酸专一性的增加显然涉及到下列可以在本发明的实施中操纵的因素。乙烯亚胺单体和乙烯亚胺寡聚物包含单个氮丙啶基(图1)。作为亲电子试剂的氮丙啶的反应性随着氮丙啶氮的质子化而显著增加。因此，这些化合物在氮丙啶基质子化的形式可能是唯一的反应形式。氮丙啶通常的亲电子反应的速率应该与它们在溶液中的质子化形式的浓度成比例。

图1的化合物 I 到 V 在氮丙啶基的 $pK_a$ 以及氨基的数目、相互排列和 $pK_a$ 方面各自显著不同(表1)。因此，这些化合物反应形式(其中氮丙啶基被质子化)的比例以及它们的总平均正电荷都显著取决于pH(表2)。

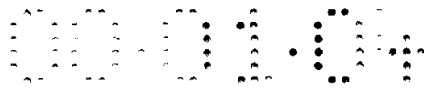


表1

寡聚乙烯亚胺的可质子化基团的 $pK_a$ 值

	氮丙啶基	伯氨基	仲氨基	叔氨基
单体(I)	8.10	-	-	-
三聚物(III)	4.10	10.0	7.35	-
四聚物 (IV)(直链)	3.3	10.0	7.05*	-
四聚物 (V)(支链)	3.0	10.0	-	6.4

\*两个仲氨基的平均值

5

\*\*两个伯氨基的平均值

10

氮丙啶对蛋白和多核苷酸的作用导致氨基酸残基和碱基上亲核基团的氨基烷基化。氮丙啶与许多亲电子试剂一样,优先在嘌呤的N7、N3和N1修饰核酸,而在嘧啶的N3上修饰的程度要低得多。烷化剂阻碍了模板合成,主要是由于打开N7烷基化的嘌呤(主要是鸟嘌呤)的咪唑环要相对慢。例如,乙烯亚胺修饰鸟苷产生N7(氨基乙基)-鸟苷, N7(氨基乙基)-鸟苷显示比N7-烷基化鸟苷以更高的速率打开咪唑环。

15

20

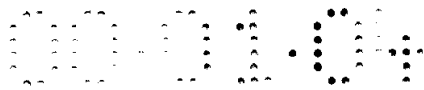


表2

乙烯亚胺寡聚物(A)的总平均正电荷以及它们的氮丙啶基质子化的程度(B)

pH值	A			B		
	6.5	7.5	8.5	6.5	7.5	8.5
单体(I)	0.96	0.80	0.28	0.98	0.80	0.28
三聚物(III)	1.88	1.41	1.04	$4.0 \cdot 10^{-3}$	$4.0 \cdot 10^{-4}$	$4.0 \cdot 10^{-5}$
四聚物 (IV)(直链)	2.67	1.41	1.01	$6.3 \cdot 10^{-4}$	$6.3 \cdot 10^{-5}$	$6.3 \cdot 10^{-6}$
四聚物 (V)(支链)	2.44	2.07	1.98	$3.2 \cdot 10^{-4}$	$3.2 \cdot 10^{-5}$	$3.2 \cdot 10^{-6}$

5 根据试剂在溶液中的平均浓度计算, 在pH 7.5下从乙烯亚胺单体(I)到乙烯亚胺四聚物(IV和V)的转变导致噬菌体感染力灭活的有效速率常数(k)增加了两个数量级以上(表3)。这样一种转变导致氮丙啶基的 $pK_a$ 值降低了五个数量级。因此, 在这个pH下, 该试剂反应形式的比例降低了约四个数量级(表2)。因此, 根据试剂的反应形式在溶液中的平均浓度计算, 在pH 7.5下从单体到四聚物的转变导致速率常数( $k_1$ )增加了约六个数量级。

10

15

20

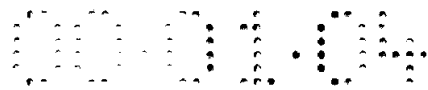


表3

根据试剂的反应形式的总平均浓度计算，在0.15M NaCl中20℃下通过寡聚乙烯亚胺作用的噬菌体MS2感染力灭活的速率常数 ( $M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )( $k_1$ , 在括号中)

pH值	6.5	6.9	7.5	8.5
单体(I)	-	-	$1.5 \pm 0.07$ (1.25)	-
二聚物(II)	$102 \pm 3^*$ ( $2.4 \cdot 10^3$ )	$35 \pm 2.3$ ( $2.0 \cdot 10^3$ )	$13 \pm 1.4$ ( $2.9 \cdot 10^3$ )	$1.7 \pm 0.05$ ( $3.8 \cdot 10^3$ )
三聚物(III)	-	-	$47 \pm 2.7$ ( $1.5 \pm 10^5$ )	-
四聚物**	-	-	$150 \pm 12.5$ ( $3.6 \cdot 10^6$ )	-

5

\*使用存活曲线的起始部分计算速率常数

\*\*直链四聚物和支链四聚物的等摩尔混合物。

10

作为寡阳离子，乙烯亚胺寡聚物对多核苷酸有高亲和力，这在它们的结合常数中反映出来。这个结合常数受到静电相互作用的影响，与寡阳离子和聚阴离子的体积电荷密度成比例，并因此随着聚阳离子的总平均正电荷而增加。从乙烯亚胺单体到乙烯亚胺寡聚物的转变导致所述分子总平均正电荷的显著增加(表2)。此外，乙烯亚胺寡聚物中可质子化基团之间的距离与多核苷酸的核酸间磷酸基团之间的距离相似。因此，在单体到四聚物的转变时，寡聚乙烯亚胺中可质子化基团数目的增加应该导致它们与多核苷酸(例如病毒RNA)的结合增加。

15

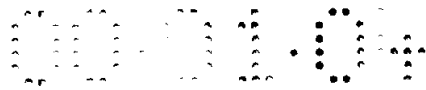
许多用于修饰核酸的烷化剂对多核苷酸并没有显著的亲和力。将对多核苷酸修饰的pH依赖性与核酸碱基的 $pK_a$ 值相比较，表明在



6.0-8.0的pH范围内，主要是核酸碱基的中性形式被烷基化。pH的进一步增加应该导致鸟苷和尿苷更具有反应性的去质子化形式的比例增加，并因此导致噬菌体灭活速率增加。然而，噬菌体感染力灭活的速率常数在pH 8.5下比在pH 7.5下低(表3)。因此，至少在这个pH范围内，该试剂的反应形式的比例对灭活速率的影响比核酸碱基的反应形式的比例的影响要大。因此，在计算pH 6.0-8.5范围内的感染力灭活速率常数时，我们假定反应形式的核酸碱基(去质子化)的比例是基本恒定的。因此对于寡聚乙烯亚胺对噬菌体MS2的灭活来说，灭活速率常数的pH依赖性主要是由于灭活剂反应形式的比例以及总平均正电荷所引起的。

pH从8.5下降到6.5导致有效灭活速率常数增加60倍。这与这种试剂在溶液中的反应形式比例的增加相关(表2和表3)。因此，在这种情况下，pH对灭活速率的影响主要由反应形式在溶液中的浓度变化决定。然而，应该强调的是，总平均正电荷的pH依赖性对三聚物和四聚物来说比对单体更显著(表1)，这导致用三聚物和四聚物对多核苷酸修饰的速率比用单体和二聚物有更大的变化。

使用传统的灭活剂修饰病毒体任何成分的速率通常被认为是该试剂平均溶液浓度的函数。然而，假如一种低分子量的试剂对某种聚合物有专一亲和力，那么该试剂在这种聚合物附近的局部浓度比试剂的平均溶液浓度要高，并随着与该聚合物距离的增加而指数性地降低。对病毒基因组灭活的选择性应该与该试剂在这些聚合物附近的局部浓度的差异成比例。因此，甚至寡聚乙烯亚胺浓度在所述基因组附近的局部增加应该优先增加它的修饰速率。然而，正如上面所考虑的，在乙烯亚胺寡聚物和多核苷酸之间形成复合物应该增加氮丙啶基质子化的程度，并进而增加多核苷酸修饰的速率常数( $k_1$ )。因为试剂浓度随着距离而指数性地降低，所以距离该聚合物1-2nm处的试剂局部浓度基本与试剂的平均溶液浓度相同。显然，在此距离试剂反应形式的比例应该与溶液中处于游离(非结合)状态的试剂反应形式的比例



相同。因此，所述灭活剂浓度在多核苷酸附近的增加以及灭活剂与多核苷酸的结合应该不影响衣壳成分，特别是病毒体表面抗原携带区域的修饰速率。通过使用本发明的选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂，可以增强对病毒基因组灭活的选择性，其中所述灭活剂与传统使用的灭活剂相比对核酸具有专一性亲和力。

所有这些数据和考虑使得人们能够选择乙烯亚胺三聚物或四聚物，同时获得对多核苷酸亲和力的增加以及修饰病毒基因组的反应速率和选择性的提高。如上所示，这样的转变导致选择性增加至少六个数量级。因此，即使乙烯亚胺单体的选择性并不比其它目前用于制备完整病毒体灭活疫苗的灭活剂强，但三聚物和四聚物的选择性的显著增加使得对病毒体成分修饰对免疫原性、稳定性和其它病毒体特性的效应可以忽略不计。

使用对多核苷酸修饰具有选择性的选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂为制备安全有效的灭活抗病毒疫苗提供了新机会。同样的方法也可以用于选择性灭活病毒，所述病毒是供体血液和血清中以及从动物组织和细胞培养物分离的医药和兽医制剂中最有害的污染物。同样的方法可以用于选择性灭活具有生物活性(如转化)的DNA片段，这样的DNA片段可能污染包含细胞或生物聚合物的组合物。

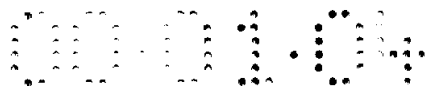
提供下面的实施例作为举例说明，而不作为限制。

### 卤素盐(halogen salt)的制备

如上所述，可以以卤化氢盐的形式提供本发明的寡聚乙烯亚胺灭活剂；优选的卤素是氯、溴和氟。

#### $\beta$ -氯-寡聚乙烯亚胺盐酸盐的制备

这些氯化物盐具有式 $\beta$ -氯- $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH})_n\text{H}$ ，其中n是2到5之间的整数，包括2和5。最优选的寡聚物盐有3或4个重复单位 $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH})$ 。三聚物氯化物盐的分子式可以表示为： $[\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2]\cdot(\text{HCl})_3$ 。四聚物氯化物盐可以表示为： $[\text{Cl-}$



$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2\text{]}\cdot(\text{HCl})_4$ 。

如下制备氯化物盐：

5 1. 3到5分钟内，滴加(最好是通过冷却的毛细管)0.6-0.7毫摩尔(约100  $\mu\text{l}$ )寡聚乙烯亚胺三聚物或四聚物到0.8ml剧烈搅拌和冷却( $0^\circ\text{C}$ )的浓盐酸中。再继续搅拌10分钟。

2. 将反应混合物倒入40ml无水乙醇中，搅拌，并在 $-20^\circ\text{C}$ 保持1-2小时。

10 3. 在水泵产生的真空下，用一个多孔玻璃滤器过滤反应混合物，将得到的晶体用15ml无水乙醇洗涤三次。在含水乙醇中重结晶。在 $50^\circ\text{C}$ 干燥。得到的是白色晶体，在水中极易溶，在冷乙醇中几乎不溶。

15 4. TLC分析：在铝箔上的硅胶凝胶板中上行。溶剂系统：新鲜制备(使用前1-2小时)的乙二醇的单甲基醚/丙酸/ $\text{H}_2\text{O}$  (14:3:3体积比)混合物，用NaCl饱和。展开约40分钟(溶剂前沿迁移约7cm)。根据常规程序，用茚三酮染色。

化合物	Mr	Tm ( $^\circ\text{C}$ )	R <sub>f</sub> 值
$\beta$ -氯-亚乙基亚胺三聚物 盐酸盐	275	200	0.86
$\beta$ -氯-亚乙基胺四聚物盐 酸盐	364.5	216	0.80

如下制备三聚物溴化物盐：

20 将0.79ml 48%氢溴酸(6.6毫摩尔)放入有磁力搅拌棒的玻璃广口容器(容积5ml)中，剧烈搅拌下，在水浴中将容器冷至 $0^\circ\text{C}$ 。将100mg 乙烯亚胺三聚物(0.78毫摩尔)放入带有毛细管末端的玻璃管中并冷至 $0^\circ\text{C}$ 。然后将玻璃管的毛细管末端浸入冷却搅拌的氢溴酸中，并开始慢慢加入乙烯亚胺三聚物(时间 $>1$ 分钟)。在加入三聚物时氢溴酸溶液的



黄色消失了。完成加入后，继续在0℃再搅拌20分钟，然后将混合物置于室温下。将开口容器置于装有足量固体碱(约300g)的真空干燥器中，通过油泵逐渐降低压力。在干燥器中干燥混合物直到液体完全蒸发(10到12小时)。

5 将固体残留物(白色结晶物质)溶解于约20ml沸腾的乙醇中，通过一个热玻璃滤器过滤除去固体残留物。滤液在-20℃保持约24小时。通过玻璃滤器过滤固体N1-(β-溴乙基)-二亚乙基三胺的三溴化物，用冷乙醇洗涤(3×3ml)并在25℃干燥。干燥化合物的产量是140mg(40%)。得到的白色不吸潮晶体易溶于水，难溶于冷乙醇，不溶于乙醚。Tm=176-177℃(没有分解)。根据NMR(本文未显示数据)，该化合物几乎是纯的(大于90%)。室温下搅拌母液并缓慢加入乙醚直到出现白色悬浮液，可以获得另外120mg具有同样熔点的这种化合物。置于10 4℃下过夜，然后如上所述过滤、洗涤并干燥晶体。N1-(β-溴乙基)-二亚乙基三胺的总产量是约260mg(75%)。

15

### 实施例1

#### 噬菌体灭活动力学的测定

按照常规程序制备噬菌体MS2。用聚乙二醇(PEG6000, Serva)重沉降，或在DEAE-Sephadex A25上层析并用NaCl线性梯度洗脱液20 (0.02-1.0M, 20mM Tris HCl, pH 7.4)洗脱来进行纯化。纯化的噬菌体悬浮于0.15M NaCl溶液中(2-10mg/ml)并贮存于+4℃。在长有大肠杆菌CA180的肉蛋白胨琼脂上，使用常规的双层技术测定病毒悬浮液感染力。

25 根据Kostyanovsky等人(1988) *Izv. Akad. Nauk SSSR* 11: 2566-2575的方法，制备乙烯亚胺(I)、乙烯亚胺三聚物(III)及直链四聚物(IV)和支链四聚物(V)。PMR的数据证实这些化合物的纯度大于95%。使用前才制备乙烯亚胺溶液：将计算好的体积的所述化合物(在20℃化合物I、III和IV(V)的具体密度分别是0.836 g·cm<sup>-3</sup>、0.945 g·cm<sup>-3</sup>和





0.968g·cm<sup>-3</sup>)加入0.15M NaCl溶液中。

5 根据用HCl电位滴定的结果，计算25℃下0.15M NaCl溶液中氮丙  
啶基灭活剂的可质子化基团的pK<sub>a</sub>值，其中电位滴定使用带有一个恒  
温室的TTT-60自动滴定仪(Radiometer)。pK<sub>a</sub>值测定的精确度不低于  
0.05。用下面等式计算所述试剂的反应形式(在氮丙啶氮质子化)的比  
例(Q)：

$$Q = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_i}}$$

其中pK<sub>i</sub>是各自化合物中氮丙啶基的pK<sub>a</sub>值。

使用下面等式计算该分子的总平均正电荷(p)：

10 
$$p = \sum_0^n nd(H_n A^{n+})$$

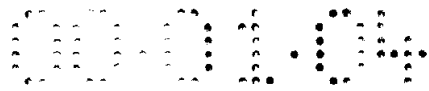
其中d(H<sub>n</sub>A<sup>n+</sup>)是在给定pH值下具有正电荷n的试剂的比例。

15 混合前，将包含病毒的组合物以及新鲜制备的乙烯亚胺寡聚物  
选择性灭活剂的溶液保存在20℃，并通过加入稀NaOH和HCl溶液调  
整pH。从20℃温育的反应混合物中以固定时间间隔取出等分物，并  
立即稀释100倍，用于测定感染力(滴度)。用下面等式计算感染力灭  
活的有效速率常数(k)：

$$k = \frac{2.3}{At} \log S_0/S_t$$

其中A是该试剂的浓度(总浓度或反应形式部分的浓度)；S<sub>0</sub>和S<sub>t</sub>是灭活  
开始前和开始后t分钟悬浮液的感染力(滴度)。

20 完全确定的电位滴定曲线的形状(图2)反映了乙烯亚胺寡聚物灭  
活剂的离子状态的变化。在单体的情况下，单个的平稳段对应于氮丙  
啶基的质子化。计算的pK<sub>a</sub>值(表1)与文献的数据(O'Rourke等人, *J. Am.*  
*Chem. Soc.* 78: 2159-2160, 1956)十分一致。对于其它化合物来说，平  
稳段对应于氨基和氮丙啶基的质子化(表1)。寡聚物II到V对酸的消  
耗表明，每种寡聚物都有一个pK<sub>a</sub>值5.15-3.0的基团，这与这些分子中  
25 单个氮丙啶基的存在相对应。分子II到V与乙烯亚胺相比显示氮丙啶



基的 $pK_a$ 值降低，这是因为更多数目的强碱性氨基增加了该分子的总正电荷，因此减少了氮丙啶基的质子化。分子IV和V的 $pK_a$ 差别较小，这很可能是由于这些分子中氮丙啶基和氨基的相互排列的差别所引起的。在化合物II到IV的情况下，要质子化大多数碱性氨基需要一当量的酸，而对于化合物V则需要两当量。这些数据与下面事实相关：在前三种化合物中各有一个伯氨基，在化合物V中有两个这样的基团。消耗一当量和两当量的酸对应于一个和两个仲氨基的存在，这种消耗对化合物III和IV分别在pH 7.35和7.05处的离子转变是必需的。化合物V在pH 6.4下离子转变时消耗一当量的酸，这对应于一个叔氨基的存在。在这些化合物中，伯氨基比仲氨基和叔氨基的 $pK_a$ 值更高，很可能是由于电子效应以及多胺分子的结构引起的。这些数据用于计算化合物I到V在任何pH值下的总平均正电荷和氮丙啶基质子化的程度(表2)。

在pH 7.5下，通过化合物I到V的作用使噬菌体MS2的感染力指数性地降低(图3)，这表明这些化合物的浓度在所用条件下保持恒定。这使得可以根据获得的数据计算感染力灭活的有效速率常数(k)。如表3所示，从乙烯亚胺单体到乙烯亚胺四聚物的转变导致这个速率常数增加两个数量级。

pH从8.5到6.5的降低导致乙烯亚胺二聚物对噬菌体感染力灭活的速率增加了60倍(图4，表3)。在pH 6.5使用这种化合物导致存活曲线的形状与指数型的那一条显著偏离(图4)。这个变化表明化合物II的浓度快速降低，很可能是由于它在这个pH下的阳离子多聚化引起的。因此仅使用存活曲线的起始部分计算化合物II在pH 6.5的灭活速率常数。使用灭活初期的速率常数和感染力灭活的最终程度计算，在pH 6.5下化合物II消耗的速率常数是约 $0.02\text{min}^{-1}$ 。



## 实施例2

### 计算灭活终点

5 包含病毒的组合物的感染力降低的程度可以实验控制至少约六个数量级，即使在增加样品体积(在合理的范围内)并利用一系列成功的方法时也是如此。然而，生产安全的灭活抗病毒疫苗需要将原始包含病毒的组合物的感染力降低至少约20个数量级。因此，通常灭活抗病毒疫苗的安全性不能仅仅由实验确定，而必须建立在本文所述的方法之上。通过动力学方法计算，可以更有意义地评价安全性。这需要  
10 对病毒灭活条件的精确动力学描述，同时考虑本发明的选择性灭活剂的特征。可以从存活曲线的早期部分(实验控制下)获得数据。

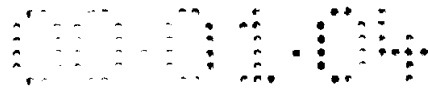
精确的动力学描述应当建立在对灭活期间的病毒悬浮液的感染力的精确测定上。技术人员应当保证感染力(滴度)测定是精确的，以保证灭活速率常数的确定和所述选择性灭活剂作用的最短时间( $t_1$ )的确定。使用下述的动力学方法，特别是当存活曲线提供了直至感染力降低特定程度的良好的动力学描述时，可以获得可靠的 $t_1$ 值。假设对  
15 病毒基因组的修饰不被其它生物因素(如DNA修复)扭曲，并假设第一个灭活损害的形成(不考虑它在病毒核酸上的位置)阻碍基因组的完全复制，在本发明的选择性灭活剂作用期间病毒的存活曲线遵循下面的等式：

$$S = S_0 \exp(-Akt)$$

20 其中 $S_0$ 和 $S$ 是包含病毒的组合物在所述选择性灭活剂的作用开始前和开始后时间 $t$ 的感染滴度， $A$ 是所述选择性灭活剂的浓度， $k$ 是灭活(即每个基因组修饰一个核苷酸残基)速率常数。

25 假设 $A$ 和 $k$ 的值在灭活期间是恒定的，那么存活曲线就是指数型的。在这种情况下，可以根据下面的等式计算要将感染力降低到给定程度所需的灭活时间：

$$t_1 = [2.3/(Ak)] \log(S_0/S)$$



应用实施例1获得的如表3所示的灭活速率常数计算灭活时间，由表3假设乙烯亚胺寡聚物的浓度是 $10^{-3}$  M(四聚物)，灭活速率常数是 $k=150$ ，(pH 7.5)， $\log(S/S_0)$ 是灭活的所需程度，在这种情况下是约20，则在实施例1中降低感染性的时间是在20℃进行15.3分钟。

5 根据本发明，根据从存活曲线起始部分获得的数据，可以确定在灭活条件下任何病毒以及本发明的任何选择性灭活剂的灭活终点。

### 实施例3

10 细小核糖核酸病毒。研究了包含单链RNA(正链)、而衣壳仅包含蛋白的甲型肝炎病毒(肠道病毒属)和口蹄疫病毒(aphthovirus)。根据常规程序，包括纯化和测定感染性和稳定性，制备上述病毒。如上所述制备本发明的选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂。测定在特定盐溶液和特定温度下所述灭活剂的 $pK_a$ 值。使用如表4所示的每种病毒的条件，将所述病毒和所述选择的病毒灭活剂(即乙烯亚胺寡聚物)在特定pH、  
15 温度和浓度下混合。

表4

20℃下乙烯亚胺四聚物作用下灭活一些动物病毒(15-20个数量级)的时间

病毒	处理条件下 的稳定性	温育时间(小时)* 试剂浓度			
		1mM		15mM	
		pH 7.0	pH 8.0	pH 7.2	pH 8.0
疱疹性口腔炎 病毒	适当的	120	1200		
A型流感病毒	适当的	1-50	10-300	0.07-0.2	0.7-2
甲型肝炎病毒	稳定	1-30	10-300	0.15-0.3	1.5-3
口蹄疫病毒	适当的	2-5	20-500	0.15-0.3	1.5-3



\*取决于病毒的类型和毒株、病毒纯化方法以及反应混合物的组成

以合适的时间间隔取出反应混合物的样品，在样品中补充硫代硫酸盐(终浓度0.1M)达30分钟，以猝灭多余的灭活剂，然后如上所述测定反应混合物的感染力滴度。使用上面的等式计算将这些病毒的感染力降低20个数量级所需的时间 $t_1$ 。例如，应用灭活的速率常数，这个常数约是500 (这是一般技术人员所知的并且是根据如实施例1所述的甲肝病毒和噬菌体MS2的基因组长度的比较)，计算灭活时间，假设乙烯亚胺寡聚物的浓度是 $10^{-4}$  M (四聚物)，而灭活速率常数是 $k=500$  (pH 7.5)， $\log(S/S_0)$ 是灭活的所需程度，在这种情况下是约20，则在本实施例中降低感染性的时间是在20℃进行30分钟。

#### 实施例4

弹状病毒。研究了疱疹性口腔炎病毒(VSV)的灭活，疱疹性口腔炎病毒是具有单链RNA和脂质包被的核壳的病毒。

在人类A549细胞中培养VSV。制备小鼠L929细胞或人类A459细胞的EMC贮液。培养和分析程序是本领域的技术人员已知的。根据在含有10%胎牛血清的DMEM培养基中的10倍连续稀释物的终点评估VSV的感染力。每个稀释物用来接种96孔微量滴定板上八个重复的人类A549细胞的孔。在37℃，5% CO<sub>2</sub>中温育72小时后，评价病毒诱导的细胞病理学。用已知方法评价报道的病毒滴度。

37℃，5% CO<sub>2</sub>在150cm<sup>2</sup>组织培养瓶中，将人类A549细胞的铺满单层与5ml  $10^7$  ID<sub>50</sub>/ml VSV在无血清DMEM中温育1小时，制备结合细胞的VSV。在这些条件下感染复数约为2.1 TCID<sub>50</sub>/细胞。为评价灭活，将所述选择性灭活剂加入结合细胞的病毒，病毒在聚苯乙烯管中的3ml等分的DMEM中。以合适的时间间隔取出反应混合物的等分物，在等分物中补充硫代硫酸盐(终浓度0.1M)达30分钟，以猝灭多余的选择性灭活剂。离心除去细胞，评价上清液和重分散的沉淀的感染



力滴度。使用上面的等式，计算将这些病毒的感染力降低20个数量级所需的时间 $t_1$ 。

5 评估在选择性灭活剂的存在下加入到全血( $5 \times 10^9$ 红细胞/ml)中的无细胞VSV的灭活。如上所述评估病毒感染力。使用上面的等式计算将降低这些病毒的感染力降低达20个数量级所需的时间 $t_1$ 。评价红细胞的结构和功能。

#### 实施例5

10 正粘病毒。评价了A型流感病毒的灭活，A型流感病毒是具有单链片段RNA(负链)和脂包被的衣壳的病毒。根据常规程序，包括纯化和感染力和稳定性的测定，制备该病毒。如上制备本发明的选择性灭活剂。测定在特定盐溶液和特定温度下所述灭活剂的 $pK_a$ 值。使用如上所示的适用于A型流感病毒的条件，在特定pH、温度和浓度下将该病毒与所述选择性灭活剂混合。如本文所述评估病毒感染力。使用上  
15 面的等式计算将降低这些病毒的感染力降低达20个数量级所需的时间 $t_1$ 。

#### 实施例6

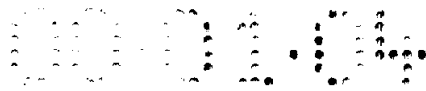
20 研究了人免疫缺陷病毒(单链RNA基因组的两个拷贝，经常突变的衣壳蛋白)。将无细胞形式或细胞内形式的HIV加入试管中的全血或红细胞浓缩物。加入选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂，并在处理样品之后测量HIV抗原。如本文所述评估病毒感染力。使用上面的等式计算将降低这些病毒的感染力降低达20个数量级所需的时间 $t_1$ 。

25

#### 实施例7

##### 反应速率与周围蛋白浓度无关

在不存在蛋白以及蛋白浓度达到3% (30mg/ml)的条件下，测定MS2噬菌体的灭活，以判定介质中的高蛋白浓度是否会显著影响与病



毒基因组反应的速率。将悬浮于0.15M NaCl中的MS2噬菌体加入等体积的人血清白蛋白中。将寡聚乙烯亚胺三聚物或四聚物加入噬菌体悬浮液，直到终浓度分别为0.4mM或0.2mM，并在pH 7.0，25℃温育。定期取出样品并分析剩余的感染力(噬菌体滴度)。计算得到的速率常数示于表5。

5

表5

在人血清白蛋白的存在下噬菌体MS2感染力灭活的速率常数

使用寡聚乙烯亚胺三聚物的灭活 (0.4mM)		使用寡聚乙烯亚胺四聚物的灭活 (0.2mM)	
白蛋白浓度 (mg/ml)	速率常数 ( $\text{mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) + SE	白蛋白浓度 (mg/ml)	速率常数 ( $\text{mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) + SE
0	10.8 ± 1.1	0	22.5 ± 4.2
10	9.8 ± 0.3	1	19.9 ± 2.2
20	10.4 ± 0.3	2	18.6 ± 1.8

10

高蛋白浓度对病毒灭活反应的速率缺乏明显的效应，这支持乙烯亚胺与病毒基因组的反应的高度选择性，并证实了核酸修饰可以在包含高浓度蛋白或其它生物聚合物的生物流体或其它流体中获得。

### 实施例8

15

噬菌体感染力灭活(核酸修饰)的专一性：

乙烯亚胺寡聚物没有修饰蛋白

20

在25℃、0.02M pH 7.0-7.2磷酸盐缓冲液中，pH 7.0-7.2，25℃，在0.9%人血清白蛋白的存在下，用乙烯亚胺单体(25mM)、三聚物(0.4mM)和四聚物(0.2mM)灭活MS2噬菌体的感染力至不同的程度。用硫代硫酸盐(终浓度0.1M)终止灭活反应后，用12.5%的还原型SDS-PAGE和非还原型SDS-PAGE以及等电聚焦(pH范围为3到7)比较从每



种温育得到的样品。

如表6所示，不论是还原型SDS-PAGE还是非还原型SDS-PAGE都没有检测到在达到80个数量级的灭活后任何白蛋白的差异，这表明这种灭活对蛋白的大小没有明显效应。

5

表6

根据SDS-PAGE分析，乙烯亚胺寡聚物对蛋白没有修饰

使用单体的灭活(25mM)		使用三聚物的灭活 (0.4mM)		使用四聚物的灭活 (0.2mM)	
灭活程度 (log10)	SDS-PAGE	灭活程度 (log10)	SDS-PAGE	灭活程度 (log10)	SDS-PAGE
0	基线模式 <sup>##</sup>	0	基线模式 <sup>#</sup>	0	基线模式 <sup>#</sup>
11	无变化 <sup>*</sup>	11	无变化 <sup>*</sup>	9	无变化 <sup>*</sup>
32	无变化 <sup>*</sup>	-	-	-	-
41	无变化 <sup>*</sup>	40	无变化 <sup>*</sup>	40	无变化 <sup>*</sup>
83	无变化 <sup>*</sup>	79	无变化 <sup>*</sup>	81	无变化 <sup>*</sup>

<sup>#</sup>对于还原型SDS-PAGE和非还原型SDS-PAGE来说，在约68kDa有占优势的主带，有约5条更高分子量的模糊条带。

10

<sup>\*</sup>在或者还原型SDS-PAGE或者非还原型SDS-PAGE上没有变化。

然而，如表7所示，用等电聚焦(IEF)对白蛋白样品的分析，显示用乙烯亚胺单体(不是三聚物或四聚物)灭活使白蛋白的电荷异质性显著增加，使之更具有碱性。这表明乙烯亚胺单体修饰了白蛋白，改变了它的电荷。与此相比，乙烯亚胺三聚物和四聚物在灭活到同等程度，即直到81个数量级时，对白蛋白电荷并没有能检测到的效应。这表明用乙烯亚胺寡聚物的灭活反应对核酸有高度选择性，而在同样条件下用乙烯亚胺单体的灭活修饰了蛋白以及核酸。

15

20



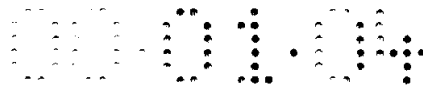


表7

根据等电聚焦分析，乙烯亚胺寡聚物对蛋白没有修饰

使用单体的灭活 (25mM)		使用三聚物的灭活 (0.4mM)		使用四聚物的灭活 (0.2mM)	
灭活程度 (log <sub>10</sub> )	IEF模式	灭活程度 (log <sub>10</sub> )	IEF模式	灭活程度 (log <sub>10</sub> )	IEF模式
0	基线模式 <sup>#</sup>	0	基线模式 <sup>#</sup>	0	基线模式 <sup>#</sup>
11	带宽增加 <sup>*</sup>	11	无变化 <sup>*</sup>	9	无变化 <sup>*</sup>
32	带宽增加 <sup>*</sup>	-	-	-	-
41	带宽增加 <sup>*</sup>	40	无变化 <sup>*</sup>	40	无变化 <sup>*</sup>
83	带宽增加 <sup>*</sup>	79	无变化 <sup>*</sup>	81	无变化 <sup>*</sup>

#在pI约5.5处有一条单条的主带。

5 \*主带的带宽增加并扩散，主要是在正电荷增加的方面(更具有碱性)。

### 实施例9

#### 有包膜的动物病毒的灭活

10 为证明有包膜的动物病毒的灭活，于22℃或37℃下在含0.2%牛血清白蛋白的0.02M磷酸盐缓冲液中，将委内瑞拉马脑炎病毒(“VE”)与乙烯亚胺三聚物(2mM)或四聚物(0.5mM)温育长至24小时。定期从温育混合物中取出样品并测定剩余的病毒浓度。由前7个小时获得的数据确定灭活速率常数。结果在下面的表8显示：

15

20

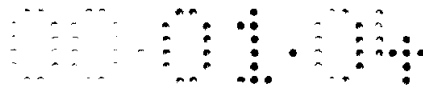


表8

用乙烯亚胺寡聚物对委内瑞拉马脑炎病毒灭活的速率常数

温度(°C)	用寡聚乙烯亚胺三聚物灭活的速率常数(mM <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> )	用寡聚乙烯亚胺四聚物灭活的速率常数(mM <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> )
25	0.33	1.64
37	1.25	3.40

实施例10

5

在有包膜的动物病毒的灭活期间抗原表位的保存

为证明在用乙烯亚胺寡聚物灭活期间抗原表位的保存，于37°C下用2mM 乙烯亚胺三聚物灭活委内瑞拉马脑炎病毒长达7小时。使用三种不同的单克隆抗体，通过ELISA测定确定灭活三小时和七小时后病毒的抗原性。测定终点的滴度并与灭活之前的病毒滴度作比较。使用的单克隆抗体是1A1B-9、7A1A-1和7A3A-4。抗体1A1B-9识别一种

10 型特异性抗原，而抗体7A1A-1和7A3A-4识别一种隐藏表位，这种表位在病毒衣壳抗原解折叠后才暴露出来。

如表9所示，在灭活超过8个数量级(灭活三小时)或估计18.7个数量级(灭活七小时)后检测不到抗原反应性的变化。

15

表9

用乙烯亚胺三聚物(2mM)灭活委内瑞拉马脑炎病毒期间抗原表位的保存

	温育时间(小时)		
	0	3	7
病毒滴度	$2 \times 10^8$	0	0
终点, 抗体1A1B-9	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$
终点, 抗体7A1A-1	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$
终点, 抗体7A3A-4	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$

## 实施例11

### 用乙烯亚胺寡聚物的溴化物盐灭活MS2噬菌体的动力学

为确定用乙烯亚胺寡聚物的溴化物盐灭活MS2噬菌体的动力学，于25℃，在pH 7.0的几种缓冲液中的一种中将噬菌体与下列试剂温育不同时间直至24小时：乙烯亚胺三聚物、乙烯亚胺四聚物、乙烯亚胺三聚物的溴化氢盐(β-溴乙基-二亚乙基三胺三溴化氢)或乙烯亚胺四聚物的溴化氢盐(β-溴乙基-三亚乙基四胺四溴化氢)。定期取出样品以测定残余的感染力，并确定感染力灭活的速率常数。表10所示的结果表明，MS2噬菌体在与所述溴化物盐温育时，溴化物盐转化成相应的乙烯亚胺三聚物或四聚物使噬菌体灭活。所述溴化物盐的灭活比在对应的乙烯亚胺寡聚物存在下的灭活速率稍慢，这表明转化仅仅约30-40%完全。尽管如此，由于卤盐的稳定性更高并且更方便，它们的使用还是优选的。这些数据也说明，磷酸盐阴离子抑制反应，大概是基于磷酸盐阴离子或聚磷酸盐的高负电荷干扰了乙烯亚胺寡聚物与核酸的相互作用。

表10

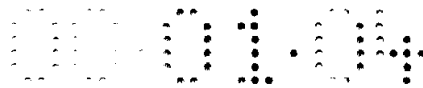
用乙烯亚胺三聚物和四聚物以及它们对应的溴化物盐灭活MS2噬菌体的速率常数

缓冲液	速率常数( $\text{mM}^{-1} \text{hr}^{-1}$ )			
	乙烯亚胺三聚物	乙烯亚胺四聚物	(β-溴乙基-二亚乙基三胺三溴化氢)	(β-溴乙基-三亚乙基四胺四溴化氢)
A	$7.4 \pm 0.6$	-	-	-
B	$7.6 \pm 0.8$	$18.2 \pm 1.6$	$3.0 \pm 0.4$	$6.3 \pm 0.9$
C	$5.1 \pm 0.8$	$8.7 \pm 0.9$	-	-
D	$0.26 \pm 0.03$	$0.32 \pm 0.04$	$0.17 \pm 0.02$	$0.29 \pm 0.04$

A: 0.15M NaCl

B: 0.075M NaCl, 0.2M MOPS

C: 0.1M NaCl, 0.025M磷酸盐



D: 0.075M NaCl, 0.2磷酸盐

5 从以上描述可以认识到，本发明的选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂和方法可以作为试剂盒的一部分用于灭活不同范围内(如在医院、实验室中)，在包含细胞或生物聚合物的组合物中通过血液传播的病毒、细菌或寄生虫。由于细胞组合物同时包含各种蛋白，本文所述的病毒灭活方法也可以适用于蛋白组分，特别是血浆蛋白组分或纯化的血液制品，包括但不限于包含凝血因子(如因子VIII和因子IX)、血清白蛋白和/或免疫球蛋白的组分。可以如本文所述用选择性乙烯亚胺寡聚物灭活剂处理蛋白组分或纯化的蛋白，完成病毒和细菌的灭活。

10 本发明的方法可以与灭活病毒的其它模式组合使用。例如，在制备医药制品中使用的某些过程(如，在低pH的缓冲液中层析，或在包含钙螯合剂的酸性溶液中贮存红细胞)可能对选定的敏感病毒、通常是有包膜病毒有伴随的灭活病毒的特性。在灭活这样的病毒时，这样的试剂可以辅助乙烯亚胺的使用。

15 虽然本发明的方法与病毒联系起来描述，但不用说，这些方法通常也可用于灭活任何在贮存的血液或血液制品中发现的生物污染物，包括细菌和通过血液传播的寄生虫。

20 虽然已经为清晰理解详细进行了上面的描述，但明显的在本文所附的权利要求的范围内可以进行某些修改。

为所有目的，所有在本申请中引用的出版物和专利文件都以同样程度完整地通过引用结合到本文中，就象每份出版物或专利文件都单独地被指出。

说明书附图

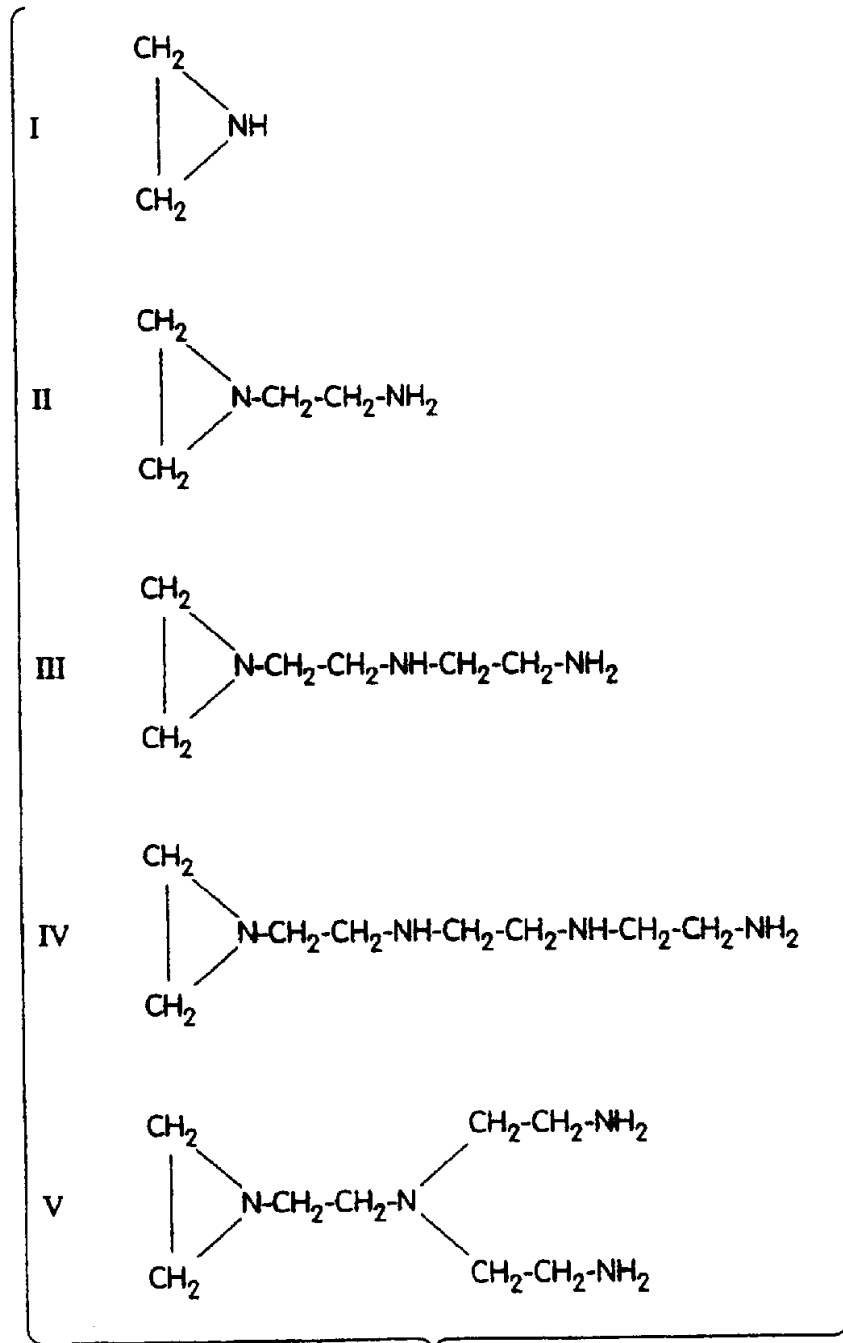


图 1

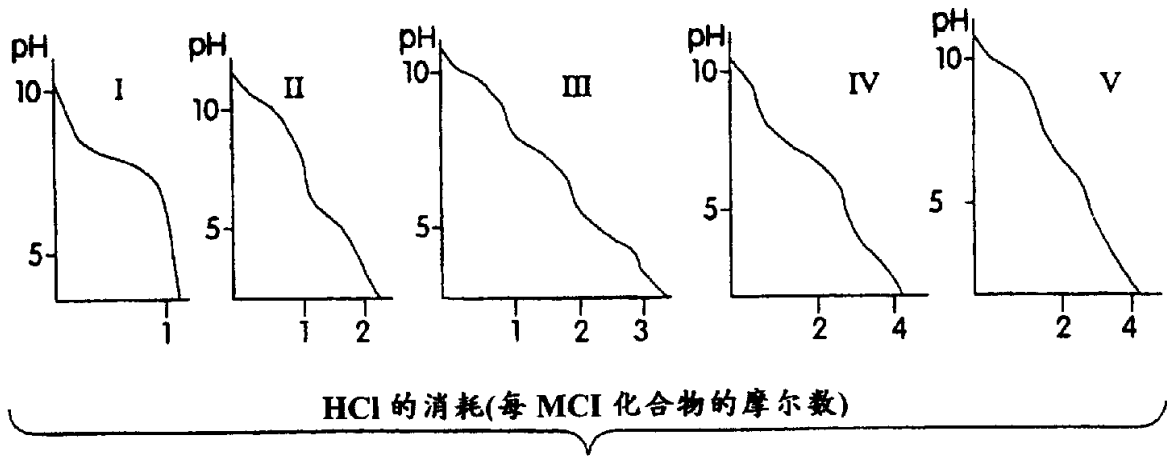


图 2

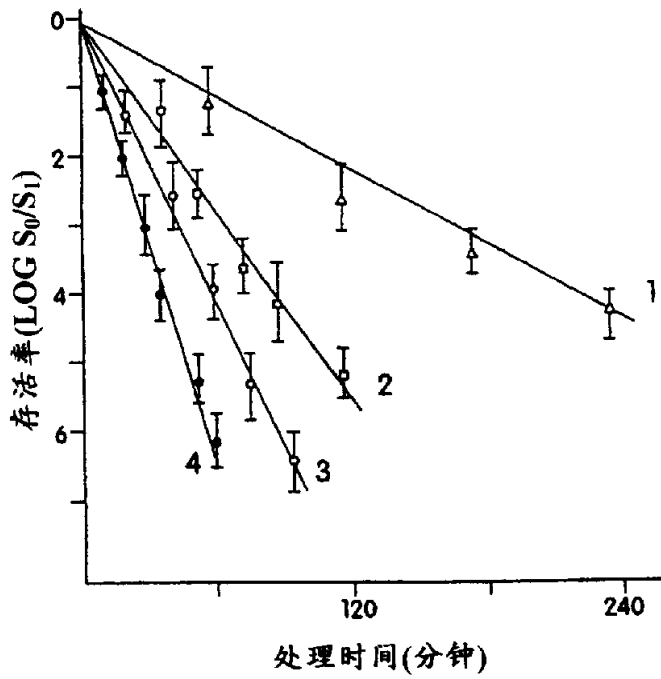


图 3

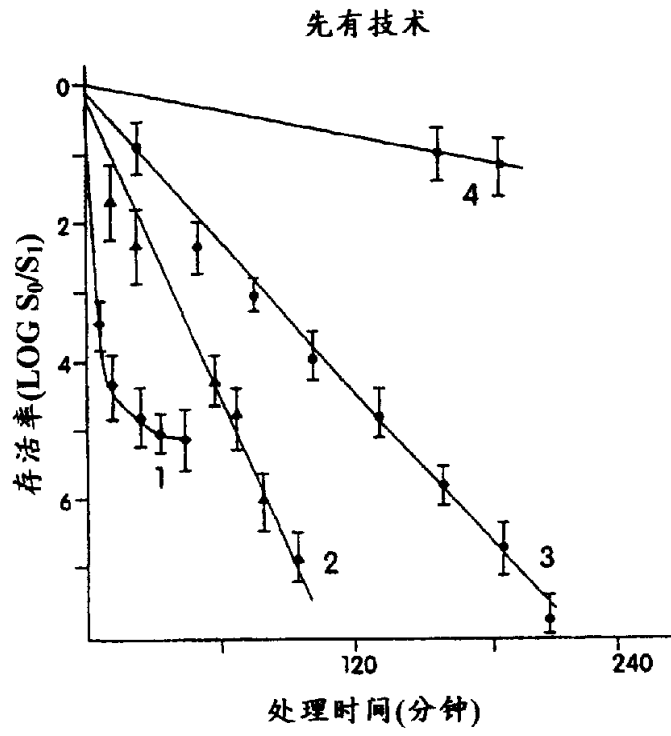


图 4