



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02822308. X

[43] 公开日 2005 年 7 月 13 日

[11] 公开号 CN 1639575A

[22] 申请日 2002. 10. 4 [21] 申请号 02822308. X

[30] 优先权

[32] 2001. 10. 5 [33] US [31] 60/327,460

[86] 国际申请 PCT/US2002/031872 2002. 10. 4

[87] 国际公布 WO2003/031987 英 2003. 4. 17

[85] 进入国家阶段日期 2004. 5. 10

[71] 申请人 斯特里斯公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 凯瑟琳·M·安特洛加

杰拉尔德·E·麦克唐奈

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任
公司

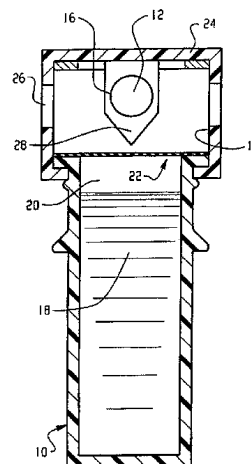
代理人 余 刚 彭 焱

权利要求书 4 页 说明书 23 页 附图 3 页

[54] 发明名称 用于抗朊病毒活性的体外模型

[57] 摘要

已经发现一种蛋白质性质的材料对由朊病毒引起的疾病如 CJD 显示出类似的活性及治疗反应。与该蛋白质性质的材料相结合的朊病毒模型具有多种用途。该模型在体内或体外均能够进行培养,对用于治疗动物体或人体的潜在药物、或对食物制品的处理方法或对可能与朊病毒接触的物品,如医学或牙科设备的快速筛查提供了可能性。利用该模型已经开发出多种治疗方法及材料。



1. 一种用于评价具潜在抗朊病毒或朊病毒相关疾病治疗的方法，其特点在于：

将朊病毒模型进行所述治疗，所述朊病毒模型对破坏朊病毒的治疗能表现出与所述朊病毒类似的反应；以及

评价所述治疗对所述朊病毒模型的治疗效果，以此作为所述治疗对所述朊病毒或所述朊病毒相关疾病的治疗效果的指示器。

2. 根据权利要求1中所述的方法，进一步特征在于：

所述朊病毒模型含有回肠液依赖生物（IFDO）。

3. 根据权利要求1或2所述的方法，进一步特征在于：

所述治疗包括去污过程。

4. 根据权利要求1-3中任一权利要求所述的方法，进一步特征在于：

所述治疗包括用过氧乙酸溶液在50-58℃的温度下处理所述朊病毒模型。

5. 根据权利要求3或4所述的方法，进一步特征在于：

将所述朊病毒模型装在容器内，所述容器包括通道，通过去污剂与所述朊病毒模型接触，给所述去污剂的进入提供激发的所述通道，至少当激发时通过装置摆正位置以便通过所述去污剂进行去污。

6. 根据权利要求 1-5 中任一权利要求所述的方法, 进一步特征在于:

所述治疗包括将朊病毒模型用已知可有效破坏微生物的过程进行处理。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的方法, 进一步特征在于:

所述过程包括用至少由过氧化氢和过氧乙酸组成的组中的至少一种接触所述朊病毒模型。

8. 根据权利要求 1-7 中任一权利要求所述的方法, 进一步特征在于:

所述治疗包括用至少包括乳酸链球菌肽、锰、和硝酸银中至少一种的组合物处理被朊病毒模型污染的医学或制药装置。

9. 根据权利要求 1-8 中任一权利要求所述的方法, 进一步特征在于:

将所述朊病毒模型施于底物, 且所述治疗包括以下步骤:
用除去蛋白质的清洁组合物清洗所述底物; 以及
将经清洗的底物与氧化剂接触。

10. 根据权利要求 1-9 中任一权利要求所述的方法, 进一步特征在于:

所述评价的步骤包括:
在生长培养基中培养残留的朊病毒模型; 以及
检测朊病毒模型的生长。

11. 根据权利要求 10 所述的方法, 进一步特征在于:

所述检测步骤包括将经培养的朊病毒模型用可检测蛋白质的程序进行处理。

12. 一种处理可能被朊病毒污染的物品的方法, 所述方法的特征在于:

用至少包括乳酸链球菌肽、锰、和硝酸银中至少一种的组合物来处理所述物品, 从而减少所述物品上的存活朊病毒的浓度。

13. 根据权利要求 12 所述的方法, 进一步特征在于:

所述物品包括用于动物或人类消耗性疾病的食品。

14. 根据权利要求 12 所述方法, 进一步特征在于:

所述物品包括医学或牙科装置。

15. 根据权利要求 12-14 中任一权利要求所述的方法, 进一步特征在于:

已发现所述组合物能有效破坏 IFDO。

16. 一种筛查对于朊病毒相关疾病具有活性的预选药物或预选处理过程或具有抗朊病毒活性的化学制剂的方法, 其特征在于:

将所述朊病毒模型暴露于所述预选药物、化学制剂、或过程中; 以及

体外培养任何残留的朊病毒模型, 所述朊病毒模型对药物、化学制剂、或过程可显示出相似的反应。

17. 根据权利要求 16 所述方法，进一步特征在于：

所述培养步骤包括：

将残留的朊病毒模型在含有血红蛋白的培养基中生长；

以及

观察所述培养基的颜色变化，以此作为残留的朊病毒模型数量的指示。

18. 根据权利要求 16 或 17 所述的方法，进一步特征在于：

用检测蛋白质的程序来检测所述经培养的朊病毒模型。

19. 根据权利要求 18 所述的方法，进一步特征在于：

所述程序检测蛋白质片段。

20. 一种治疗被朊病毒感染或患有朊病毒相关疾病的受治疗者的方法，其特征在于：

用预选的治疗药物处理被 IFDO 污染的样本，所述 IFDO 对于所述朊病毒的其它治疗药物显示出相似的反应；以及

如果所述治疗药物对破坏所述 IFDO 有效，则用有效剂量的所述治疗药物处理所述受治疗者。

用于抗朊病毒活性的体外模型

技术领域

本发明涉及感染性疾病的领域。本发明找到了一种用于评价朊病毒（蛋白质性质的传染因子）对于多种治疗的反应的特殊应用，并将参照相关文献进行详细描述。而且，本发明也同样可应用于有关朊病毒活性的其它研究。

背景技术

术语“朊病毒（prion）”用于描述能导致人类和/或动物产生类似的脑部疾病的蛋白质性质的传染因子，这些疾病常常是致命性的。这些疾病通常指传染性海绵状脑病（TSEs）。TSEs 包括人类克雅病（CJD）、以及变异性 CJD（vCJD）、牛海绵状脑病（BSE）（还被称为“疯牛病”）、羊的瘙痒病、和麋鹿的消耗性疾病。这类疾病都侵袭易感染上述特定疾病的一个动物或多个动物的神经组织。它们的特征是在较长的潜伏期后出现短期的神经系统症状，包括痴呆和共济失调，最终导致死亡。

这些疾病的传染因子被认为是一种没有相应核酸的简单蛋白质。这些朊病毒疾病的病理机制则被认为包括一种初始正常的宿主编码蛋白。该种蛋白经过构象改变成为异常蛋白（朊病毒），后者具有自身增殖能力。引起这种改变的具体原因至今未知。这种异常形式的蛋白不能在体内被有效清除，它在特定组织（特别是神经组织）内的蓄积最终导致组织损伤，例如细胞死亡。一旦发生明显的神经组织损伤，就会出现临床症状。

朊病毒疾病可以归类为蛋白质凝聚疾病，其还包括其它几种致命性疾病，如阿尔茨海默病和淀粉样变性。就 CJD 而言，人类发病最高的朊病毒疾病（发病率大约为 1:1,000,000），大约 85%被认为是散发病例，大约 10%被认为与遗传有关，而大约 5%为医源性的。其还包括其它几种致命性疾病，如 Alzheimer 病和淀粉样变性。

目前尚无针对人类或动物的朊病毒疾病的有效药物，神经症状产生之后就会导致死亡。由于不能进行体外实验，对该类治疗药物的鉴别进展缓慢。迄今为止，还没有建立一种在实验室中培养朊病毒的方法。体内研究包括给实验动物接种朊病毒并观察该动物对预期治疗方案的反应。因为病程进展缓慢，这些体内实验不可避免地会比较冗长，因而不适合对大量潜在药物进行筛查工作。小鼠和大鼠的体内模型已被处理得对朊病毒更为敏感，并且通常用于评价。另外，因为这类疾病倾向于动物特异性，这些用在动物身上的试验可否简单地应用于人类尚不可知。

某些研究机构建议利用酵母朊病毒模型进行药物评价，并且已有一些采用体外模型来研究朊病毒的报导。然而，还没有确定这些预选模型的行为表现和朊病毒活性之间的相关性的研究。

在 20 世纪 80 年代初期，从人类肠道分离出新型可复制因子。（Burdon, J. Med. Micro., 29:145-157(1989)及 Burdon; The Lancet, Vol. 353; April 10 (1999)）。这种因子从两位患有克罗恩病的患者的回肠造口术的流体中分离而得（用 0.2 μ 过滤器过滤），可进行体外培养。这种因子被命名为回肠液依赖生物（IFDO），尽管之后发现这种因子还可以在其它培养介质中存活（例如在胰酶存在的条件下）。在特异性的选择培养基上可见不连续的棕色菌落。对这种因子的检测发现，它实际上并非是病毒性的、细菌性的、或真菌类，但是可呈对数扩增并且对多种抗生素和物理及化学条件具有高抵

抗力。该种因子还被发现对湿热具有强抵抗力。最初并未将这种因子与朊病毒联系起来，也未将其用于朊病毒研究。

尽管朊病毒疾病尚未被认为具有强传染性，它们仍可在物种内进行传染，并且在一定条件下还可以发生物种间的传染。近来发现朊病毒疾病可通过高危组织（包括脑、脊髓、和眼睛）进行传染。医源性传播也有报导，包括通过硬脑膜移植、角膜移植、同种心包移植、人促性腺激素、和人生长激素的污染。还有经医用装置造成传染的报导，包括通过神经外科手术设备、深部电极、以及其它靠近中枢神经系统的外科手术装置的重复使用。

目前对于采用传统的去污和消毒方法破坏朊病毒的有效性有很多疑虑。众所周知，朊病毒是非常顽固的并且对常规去污和消毒方法具有抵抗力。某些预选的方法包括焚烧、延长高压灭菌时间、高浓度氢氧化钠和次氯酸钠处理（例如，1M NaOH 或 NaHClO₃，置于含 2% 氯离子的溶液中 1 小时）。这些破坏性的处理方法通常不适用于医学设备，尤其是柔性内窥镜和其它带有塑料、黄铜、或铝制部件的设备。许多设备可被高温损害。化学处理，如强碱，一般会对医用装置材料或表面造成损伤。戊二醛、甲醛、环氧乙烷、液体过氧化氢、大多数酚类、醇类，以及诸如干热、煮沸、冷冻、紫外线、电离、以及微波辐射等方法已通常被报道为是无效的。因而，显然需要制品和方法，其能有效地对抗朊病毒又与表面相容。

已发现的能对抗朊病毒的侵害性较小的处理方法是由俄亥俄州门托市的 STERIS 公司合成的商品名为 STERIS 20™ 的过乙酸配方。这种配方为含有过氧乙酸的混合物，其中含有缓冲剂、防腐剂、表面活性剂、和螯合剂，制备成稀释液用于高于室温条件下的消毒程序中。

然而，目前没有现成的方法用于评价抗朊病毒（“priocidal”）治疗。在采用预选的抗病毒处理之后，对用朊病毒处理过的设备进

行培养的方法包括用清洗该设备洗液接种动物并且观察病情进展状况，以判断该种抗朊病毒方法是否有效。这是一个冗长的过程而且易产生误差，这是因为残留在设备上的朊病毒数量可能太少了。另外，有一种危险因素，那些没有被抗朊病毒治疗破坏掉的朊病毒有可能对工作人员造成危害。

因此，在那些专职照料确诊的朊病毒疾病患者的医务工作者中，这种担忧日益增加。另外还有这样的担忧，由于在感染患者死亡之前未能检测出疾病的状态，通过仪器设备等物品的重复利用而可能导致疾病的传播。另外，有关高、中、低危险组织的危险度尚未明确。例如，扁桃体切除术和牙科操作曾被认为是感染朊病毒的低危操作。然而，近期证据提示其危险性可能要更高，因为已经发现有脑外组织感染朊病毒。而且还提示在朊病毒相关疾病和类似疾病状态（例如帕金森病和阿尔茨海默病）之间可能存在某种关联。

本发明提供了一种新型和改善方法，用于评价抗朊病毒活性，其克服了包括上述涉及问题在内的许多问题。

发明内容

根据本发明涉及的一个方面是提供了一种方法，用于评价可能的对抗朊病毒或朊病毒相关疾病的治疗的效能。这种方法包括为治疗提供朊病毒模型，该模型在对抗朊病毒的治疗方法下可表现出与朊病毒相类似的反应，评价治疗作用于该模型的效果，以此作为该模型对抗朊病毒或朊病毒相关疾病的效果的指示器（indicator）。

根据本发明涉及的另一方面是，提供了一种对被朊病毒污染的物品的方法。该方法包括用包括乳酸链球菌肽、锰、和硝酸银中的至少一种的组合物处理该物品，来减少该物品上残留的朊病毒的数量。

根据本发明涉及的另一方面是，提供了这样一种方法，用来筛选那些对抗朊病毒相关疾病的预选药物、治疗过程、或抗朊病毒化学制剂的效能。该方法包括用预选的药物、化学制剂或治疗过程来处理朊病毒模型，并在体外对所有残留的朊病毒模型进行培养，该朊病毒模型对这种药物、化学制剂或治疗过程显示出与朊病毒相类似的反应。

根据本发明涉及的另一方面是，提供了一种治疗被朊病毒感染或患有朊病毒相关疾病的受治疗者（subject）的方法。该方法包括用预选的药物来治疗被 IFDO 污染的样本，该种 IFDO 对其它治疗药物的反应与朊病毒相似。如果该治疗药物对抗这种 IFDO 有效，就用有效剂量的该种药物来治疗该受治疗者。

本发明的一个优点是可以在体外对那些预选的治疗朊病毒疾病的方案、药物、和制剂进行筛选，而不需要更多的体内研究。

本发明的另一优点是能迅速地对预选的治疗朊病毒疾病的方案和抗朊病毒药物进行评价。

本发明的另一优点是能使得被朊病毒污染的仪器设备、坚硬的表面和食品能更安全地投入使用。

本发明的更进一步的优点对于本领域技术人员来说，在阅读和理解以下优选具体实施例的详述后将是显而易见的。

附图说明

本发明可采取各种组分和组分排列、以及各种步骤和步骤排列的形式。附图仅是为了说明优选的具体实施例，而不是限制本发明。

图 1 是包括根据本发明的朊病毒模型的生物指示器的示意性侧视图；

图 2 是图 1 中的生物指示器关闭盖子以密封该指示器并将朊病毒模型与培养基混合后的示意性侧视图；

图 3 是在不同过乙酸初始浓度水平下随过乙酸处理过程的时间对朊病毒模型计数的示意图；

图 4 是第一对照样本（水-红细胞）、第二对照样本（胰酶制剂-Panc）、以及朊病毒样本（标记了的 IFDO）的红细胞总数与时间的关系示意图；

图 5 是第一对照样本（水-红细胞）、第二对照样本（胰酶制剂-Panc）、以及朊病毒样本（标记了的 IFDO）的正常结构红细胞百分比与时间的关系示意图。

具体实施方式

本文中称之为“试验蛋白质”或“朊病毒模型”的一种不常见的蛋白质类实体被发现与朊病毒活性相关，因而可被用作模拟朊病毒模型。该朊病毒模型被发展成为朊病毒抑制/失活的指示器，并且在体外和体内表现出与朊病毒的失活具有相关性。

优选的试验蛋白质最初由英国伯明翰伊丽莎白王后医院微生物学系（Department of Microbiology, Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, England）的 D.W. Burdon 分离出来。它最初提取自克罗恩病（节段性回肠炎）的患者的回肠液，其本质上是蛋白质。它看起来含有结合铁并且可能含有 RNA 组分。显微镜放大 100 倍显示该朊病毒模型包括具有大小和尺寸不统一的多晶颗粒。随后发现该因子在血液和血清样本中也存在。

然而，可以设想，其它对破坏性处理具有与本发明的试验模型相同或相似反应的蛋白质，也可作为替代用作朊病毒模型。

该试验蛋白质很容易在诸如琼脂或液体培养基这样的人工培养基上进行培养。它可被置于培养基中或悬浮于水或其它液体中。当存在溶化红细胞时该蛋白质可有效地生长，因此，优选地，培养基内含有来自人类或其它动物的红细胞或其提取物（如血红蛋白）。因为已经发现朊病毒模型在相当一部分血液样本中存在，优选地，在将血液用于生长培养基之前先进行筛查，以避免体外试验的任何竞争性反应和要进行体内培养的样本被污染。

只有极少的活性物（actives）对抑制朊病毒模型在培养基上的生长有效。在那些有效的活性物中，许多已经表现出对抗朊病毒（包括 vCJD）的活性，这显示出该模型与实际朊病毒活性的相关性。这些有效活性物包括氢氧化钠（大约 1M NaOH）以及由俄亥俄州门托市的 STERIS 公司出售的商品名为 LpH™ 的以苯酚为基本成分的配方（剂型）。商品名为 STERIS 20™ 的以过乙酸为基本成分的配方，以前已经被发现具有抗朊病毒的活性，并且现在已经被发现具有对抗朊病毒模型的活性。其它的具有相当活性的活性物现在已经被确定用于朊病毒模型，包括乳酸链球菌肽、新霉素硫酸盐、硝酸银、以及锰。

因为对于多种治疗，朊病毒和本试验蛋白质显示出的反应高度相关，该试验蛋白质可在体外作为模型用于筛选大量可能有效的药物、抗朊病毒因子、处理过程等等（所有这些统称为“治疗（treatment）”）的抗朊病毒和朊病毒疾病的效果。那些在体外研究中被证明对朊病毒模型有效的方法可进一步用于体内试验，例如，通过用朊病毒接种动物并对其实施口服疗法（例如，用于治疗朊病毒疾病的预选药物），或者通过用所选治疗方法（如用于医疗器械的抗朊病毒试剂）处理朊病毒样本并且之后将该样本在体内进行培养，来确定朊病毒是否已被所选治疗方法破坏掉。

利用朊病毒模型，可对传统抗微生物方法（如过氧乙酸、蒸汽、或过氧化氢蒸汽）对抗朊病毒的有效性进行评价。对传统抗微生物疗法的改进可以考虑将其优化为能够破坏或灭活朊病毒或相反可以破坏或灭活通过该过程被代表性地破坏的其它微生物。改进的过程接着能够被用于处理被朊病毒及微生物两者都污染的设备。新颖的活性物，特别是被设计用于处理朊病毒，也能够被评价。

朊病毒模型的另一用途是开发可能被朊病毒污染的食品的处理方法，通常指那些含有动物性制品的食品。这些食品包括，例如，生肉（包括胴体肉、肉块、或碎肉制品）和熟肉制品（如香肠、火腿、加工过的肉类制品）等。利用朊病毒模型，一些处理方法得到了验证。因而建立了处理可能被朊病毒污染的动物或人类食品的方法。该方法包括用一种组合物处理食品，该组合物包括乳酸链球菌肽、锰、和硝酸银中的至少一种，用足够的浓度处理足够的时间，来降低食品中朊病毒的浓度或使存在的朊病毒失活。动物性制品或那些用于制备动物饲料的制品也可在制备前或制备后用这种组合物进行处理。

在另一实施例中，开发了一种处理可能被朊病毒污染的如医学或牙科设备等物品的方法。该方法包括用含有乳酸链球菌肽、锰、和硝酸银中的至少一种的组合物处理物品，以降低这些物品上的朊病毒水平。组合物中活性物的浓度和处理时间的长短依据活性物的种类和所需的病毒降低幅度而定。该处理可以与其它已知用于降低朊病毒的处理，如水蒸气高压灭菌和/或氢氧化钠或次氯酸钠处理联合使用。

尽管也考虑了干的或非水性组合物，但用于处理食品或设备的组合物优选是液态，如，一种活性物的水溶液。处理方法可包括，例如，将要处理的物品浸渍于处理溶液中、喷雾、或将物品与溶液接触、或将物品暴露于含有活性物的蒸汽中。

利用朊病毒模型建立的另一种处理方法是，用液态或气态氧化物来处理可能被朊病毒污染的物品。例如，采用以过氧乙酸为基本成分的溶液。该方法能有效处理医学和牙科等设备，尤其是那些用于脑部或其相关外科手术的设备。已经发现温度对抗朊病毒活性有明显影响。过氧乙酸溶液的优选温度为 45-60℃，更优选地为 53-57℃。假定在较高温下活性的降低可能是由于蛋白质的凝集，致使蛋白质更不易于与过乙酸接近。温度改变对破坏其它污染物（例如微生物）也是有效的。这为用于灭菌和减少或清除朊病毒两种过程提供了可能性。过氧乙酸溶液优选地应含有缓冲液、表面活性剂、螯合剂，并且还可以包含防腐剂以减少对仪器或所处理系统的损害。在该配方中表面活性被认为尤为重要，因为它们可以影响朊病毒模型的构象结构，使得过氧乙酸更为有效。对于快速处理朊病毒而言，优选的过氧乙酸浓度至少为 2000ppm，更优选为约 2500ppm。过乙酸浓度在 2000-2500ppm 范围已经被发现将蛋白质分解成无活性的形态（小肽或氨基酸）。较低的温度和浓度一般是效果较差的。较高的温度对温度敏感的设备可能有损害并且也降低过乙酸的半衰期（half life）。

过乙酸处理过程可用于替代传统的、强烈的诸如水蒸气/氢氧化钠这样的朊病毒处理。或者，过乙酸处理可以用于与其它处理联合使用。一种预选（推荐）的处理方案包括：

1. 用对去除蛋白质性质的材料（尤其是朊病毒）有效的清洁剂清洗设备；

2. 用水蒸气热处理或高温（如 180℃）热冲洗（可选的，或者可以在步骤 3 之后进行）；

3. 灭菌处理，例如，用过乙酸配方在 2000ppm 或高于 2000ppm 并在温度为 55-57℃ 下持续处理 10-30 分钟。

优选地，清洁剂为碱性清洁剂或酶清洁剂。通过朊病毒模型的测试已经显示出该处理过程的效果随清洁制品的碱性增加而增加。强碱制品，诸如以氢氧化钠或氢氧化钾为基本成分的制品，如 CIPTM 100（从俄亥俄州门托市的 STERIS 公司获得）已经发现具有特殊的效果。尽管被称为“强碱”，但该制品具有比目前被推荐用于朊病毒处理的 1N 氢氧化钠低得多的碱浓度（CIPTM 100 在 2 盎司/加仑中含有 0.07M 氢氧化钾）。因此，碱性清洁制品的组合物以碱浓度约为 0.02M 至 0.1M 洗涤经过乙酸处理后的设备，对于用 1N 氢氧化钠的处理过程是一种有效的可供选择的过程，并且对医学设备或其它被处理的物品具有更小的损害。

在另一实施例中，已经开发了一种用于筛查推荐的对抗朊病毒相关疾病具有活性的药物或推荐的具有抗朊病毒活性的处理过程或化学制剂的方法。该方法包括将朊病毒模型暴露于预选的药物、化学制剂、或过程中，并将所有残留的朊病毒模型进行体外培养。该朊病毒模型是一种模型，该模型已经被示出显示与朊病毒对于其它活性物或过程的相似反应。

在另一实施例中，用于评价预选的处理过程、药物、或其它抗朊病毒的活性物的方法包括将抗朊病毒模型暴露于预选的处理、药物、或其它活性物中。在暴露之后，该朊病毒模型（或任何残留的可生存的）在一种适合的生长培养基中生长。

例如，在一种处理过程的情况下，诸如灭菌过程，取样管或设备用朊病毒模型进行污染，并且被暴露于灭菌或清洁处理中。在该处理后，采集拭子、样本、或提取物并置于生长培养基中。如果观察到朊病毒模型的生长，则灭菌或清洁处理对朊病毒的破坏或去除不是完全有效的。

在对潜在活性物的评价的情况下，药物或其它活性物的溶液与朊病毒模型进行混合。在经过选定的暴露时间之后，该溶液的等分

试样被提取并在生长培养基中进行培养。在进行培养之前，该等分试样优选采用合适的中和剂进行中和，以便在测试条件下使药物或其它活性物失效。如果证明该药物或活性物对朊病毒模型有效，它可被以有效剂量用于处理主体，例如，被污染的表面或患有朊病毒相关疾病的人或动物。

在一个实施例中，在生长培养基上的效力被用作朊病毒模型的（并由此，可推及朊病毒）活性的指示器。生长培养基优选含有血红蛋白、或以纯的或相对纯的形态、或与其它相关的血液制品混合。例如，生长培养基可以含有溶化的全血或溶化的红细胞。如果经处理程序或所选活性物处理后仍有朊病毒模型存活，随着朊病毒模型的“生长”，培养基上的血红蛋白含量会减少。血红蛋白含量的降低可通过在培养基中深红色的减退被观察到，或通过其它的检测技术，例如化学分析、比色法、光谱法、或其它类似方法被观察到。如果培养基是固体培养基，如，琼脂凝胶，可在朊病毒模型周围观察到环状的颜色改变，其大小随时间增加。因此，该模型的破坏/灭活可以依据培养过程起始之后在某一特定时间血红蛋白环的大小来测定。或者，当与液体培养基接触，该培养基的颜色变化可以用作朊病毒模型残留数量的一种指示。

在一个实施例中，将用于测试预选的处理过程（例如氧化剂为主的过程，如一种以液体或蒸汽形式使用的过氧化氢或单独过酸或其组合）用于在医学设备或其它装置上破坏朊病毒，朊病毒模型被置入一种生物指示器中，该指示器在传统上用于检验对抗目标微生物（通常较难杀灭的）的灭菌或灭菌过程的效果。一种这样的指示器在图1中加以举例说明，尽管其它已知的生物指示器设计也可以作为选择加以使用。该指示器包括容器10，该容器中含有朊病毒模型的样本12，优选地包含于该容器中，以便样品不易于在处理过程中从容器中被洗掉或被除去。准确的密封装置模式将取决于处理过程的类型。在液体灭菌剂，例如过乙酸存在的情况下，朊病毒模型

包含在蛋白质不可渗透的膜中，该膜允许液体灭菌剂透过。对于气体灭菌剂，例如过氧化氢蒸汽、或过乙酸蒸汽，朊病毒模型可以被简单地置于容器壁的内表面 **14** 上或被支撑于载体 **16** 上，例如，纸、不锈钢、或聚酯（polyflex）的盘子。可将适宜的生长培养基在指示器进行预选的处理过程之前加入到该指示器中。更优选地，将朊病毒模型与适宜的生长培养基在测试之后进行混合。在一个实施例中，生长培养基 **18** 包含于在容器中的蛋白质可穿透的或易碎的安瓿 **20** 中，在将指示器从预选的处理方法中移出后，再将生长培养基与朊病毒模型相混合。混合生长培养基与朊病毒模型的方法是通过从开放位置移动帽 **24** 打碎安瓿或穿透部分壁 **22**，如图 1 所示，其中灭菌剂已经通过开口 **26** 进入容器，进入关闭位置，如图 2 所示，其中该帽将容器密封，从而阻止流体的进出。在图 1 和 2 的实施例中，帽具有突出部 **28** 用来刺穿壁 **22**。观察到残留的朊病毒模型的生长，例如，通过培养基的颜色变化或培养基在物理或化学性质方面其它可检测到的变化。颜色变化可以归结为，例如，朊病毒模型的产物（其出现黑色），培养基的血红蛋白含量的降低，或可以是在朊病毒模型和培养基中存在的一种化学指示器之间生成的中间体的结果。可观测到的颜色变化是指示预选的处理过程作为对于被朊病毒模型污染的设备或其它物品的处理过程不是有效的。

在一个实施例中，指示器包括朊病毒模型的样本及微生物的样本，该微生物已知对研究中的处理过程的类型具有高的抗性。在将指示器进行预选的处理过程之后，该指示器通过残留的朊病毒和/或微生物进行评价。因此，开发和优化了对抗朊病毒和微生物均有效的处理方法。

生长培养基

已经开发一种合适的生长培养基用于培养朊病毒模型。生长培养基含有琼脂或肉汤基质，例如 MycoplasmaTM 琼脂或肉汤基质，

是从 Oxoid 获得的。一种血红蛋白源，例如将来自于人体或其它动植物的红细胞经过洗涤及溶解，也是现存的。就上述讨论而言，优选地，红细胞进行测试以确定在用于生长培养基前不存在朊病毒。培养基还优选含有蛋白酶源。该蛋白酶源可以是一种经分离的蛋白酶、酶提取物，该酶提取物还可含有其它酶，如脂酶、或被粉碎的动物组织，如胰酶制剂，该胰酶制剂通过将胰腺组织均化而获得。优选地，存在诸如吐温 80 这样的分散剂。乙酸铯是可选的用于降低培养基污染的组分。将该组分与水进行混合，优选地，蒸馏水或其它净化水。

已经开发了下列典型的生长培养基用于与测试蛋白质一同使用：

蒸馏水	1000mL
琼脂或肉汤基质（如 Oxoid Mycoplasma™）	10-100g
分散剂（如吐温 80）	0-5mL
经洗涤并溶解的马红细胞	10-40mL
马血清	0-10mL
0.1g/mL 胰酶制剂	10-40mL
2%乙酸铯	2-20mL

测试朊病毒模型的“存活能力”（如在预选的处理过程之后），将含在朊病毒模型中的培养基或稀释液的等分试样注射入已知体积的上述培养基中，并在约 37℃ 下培养约 48-72 小时。测试蛋白质会在液体培养基内以黑色沉淀的形式“生长”，或在培养皿表面呈现为不连续的“菌落”。尽管按常规理解朊病毒模型并非有机体，但在培养过程中数量上确实是增加的，因而用术语“生长”及类似术语来描述朊病毒模型的增加。术语“存活”用来表示能够显示生长能力的朊病毒模型，即它尚未被破坏或灭活。

为准备体外试验，测试蛋白质的液体培养物在约 5000xg 下离心沉淀（迅速旋转）约 5 分钟并在水或新鲜培养基中进行清洗。

模拟抗朊病毒活性的测试可以与对细菌或真菌的典型测试类似地进行。这些方法包括：

1) 最低抑制浓度 (MIC)：这种方法可对大量抑制试验蛋白培养的活性物（有效物）进行快速筛选。在具有微孔平板的简单结构中，进行活性物的连续稀释，并在各个浓度的培养基内加入标准低浓度（如小于 10^5 实体形成单位(efu's)）的朊病毒模型。在 37℃ 下孵育 48-72 小时，生长的存在通过孔底部的黑色沉积物显示，能抑制生长的活性物的最低浓度被记录为 MIC。这种方法可用于鉴别可能的对抗朊病毒活性的靶药物或生物杀灭剂。

2) 时间杀伤 (time kill) 试验：这种方法可以确定活性物或剂型（配方）随时间的效力。将测试材料（例如，液体剂型、制品、或活性物）制备成多种浓度并置于多种环境条件（例如，pH 值、温度、污染物的存在、以及类似情况）下。朊病毒模型在已知浓度下培养，然后被直接加入到测试液体中并且等分测试样随时间变化被移出用于评价。优选地通过中和来抑制待测材料进一步的活性。评价可包括等分试样被连续稀释并在选择性培养基上平皿培养，以测定在所选条件下测试蛋白随时间的减少。

在另一测试中，可将含有测试蛋白质的培养物接种于底物上并且暴露于液相或气相活性物中持续选定的暴露时间。可回收的测试蛋白质通过连续稀释及平皿培养进行测定。

3) 蛋白降解研究：将含有培养基的蛋白质（测试蛋白质或其它诸如某种含有高比例 β 折叠结构的类似于朊病毒蛋白质的蛋白质）进行处理程序，例如过乙酸的处理，然后通过凝胶电泳或其它能够从较小的片段中分离出完整蛋白质的技术来对等分试样进行

评价。几种有效的抗朊病毒制剂被发现能将朊病毒分解成较小片段。因而，可以观察到将测试蛋白质或其它蛋白质分解的试剂可以用作潜在的朊病毒处理制剂。

这种测试用于优化给定的对抗测试蛋白质的配方、活性物、或过程的效力是有价值的。测试对于理解配方或环境因素对于抗朊病毒的活性物/生物杀灭剂的活性的影响方面尤为重要。更优选地，采用一种以上的测试，例如，用于预选的处理及在评价预选的处理之前进行对于朊病毒自身的时间（定时）杀伤研究及蛋白质降解研究。

下列实施例显示朊病毒模型作为实际朊病毒的功效，以及对多种预选抗朊病毒疗法的功效。

实施例

实施例 1：生长培养基

制备下列生长培养基：

蒸馏水	1000mL
Oxoid Mycoplasma™ 琼脂或肉汤基质	35.5g
吐温 80	2mL
经洗涤并溶解的马红细胞	20mL
马血清	1.4mL
0.1g/mL 胰酶制剂	20mL
2%乙酸铊	7mL

当将测试蛋白质接种于具有上述配方的补给性支原体肉汤平板培养基皿的底部，并在 37℃ 下进行培养时，在需氧的、微需氧、

或厌氧的条件下，在 48 小时后接种点会产生不连续的棕色菌落。
在 4℃时观察不到生长现象。

实施例 2：测试蛋白质的组成

测试蛋白质经分析和测定包含下述氨基酸，并且至少有两种肽。

当经过 ICP 检测，能观察到最初的铁（虽然钙本底被看到，但是推测全部来自于培养基）。

总氨基酸分析

朊病毒模型培养物在肉汤中生长，剧烈冲洗（用盐水漩涡冲洗 5 次）并干燥。样本进行总氨基酸分析。样本在 110℃下，在 6N HCl 中水解 26 小时，溶于 0.01 N HCl 并进行色谱分析。

结果用下列百分数表示存在的氨基酸：

ASP	8.30%
THR	3.36%
SER	9.08%
GLU	7.38%
PRO	5.24%
GLY	10.96%
ALA	7.11%
VAL	5.97%
ILE	2.41%
LEU	12.14%
TYR	1.61%

PHE	3.60%
LYS	5.84%
HIS	11.26%
ARG	5.70%

蛋白质分析

朊病毒模型蛋白质被溶解且蛋白质凝胶进入上清液。利用 SDS-PAGE 分离蛋白质。观察到弥散的蛋白带出现在染料前部上方 (<10kDa)。用蛋白印迹法将这条带转移到膜上,并提交至分子生物中心的 CCF 进行 N-末端序列分析。信号微弱但显示出下列两条肽链序列:

K L L/D H/W Q S Q/L H K/M Q R F

I Q K H I L Q K/I M/L A L E

实施例 3: 相关性研究

为证实时间-杀伤 (time-kill) 测试的效力,并确立测试蛋白质与已知朊病毒的反应相关性,利用已知对抗朊病毒有效的物质对测试蛋白质的对数减少进行测量。对数减少是有机体初始存在的数量 (在此,指测试蛋白质的数量,或者为测试蛋白质在样本中的浓度值) 的对数值和残留数量对数值之差。发现对于这类活性物而言相关性很好。下面给出具体实施例:

a) 过氧乙酸研究

先前被推荐用作有效的抗朊病毒的试剂的特定过乙酸配方 (STERIS 20™ 从俄亥俄州门托市的 STERIS 公司获得) 被发现对于抗朊病毒模型是有效的。STERIS 20™ 是一种含有缓冲液、表面活性剂、螯合剂、及防腐剂的以过乙酸为基本成分的灭菌剂。测试

结果表明配方的温度是重要因素。发现温度及活性物浓度对于蛋白质与朊病毒的灭活具有不寻常及重大的影响。

i) 蛋白降解研究

蛋白质降解研究通过将朊病毒模型的样本暴露在灭菌剂（例如过乙酸）及对照液（如，水或三羟甲基氨基甲烷缓冲的盐水，TBS）中。在暴露之后，过乙酸立即用硫代硫酸钠（STS）中和并且样本通过凝胶电泳被分离。癸基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）用作蛋白质分离介质是有效的。此外，HLC 分析已经表明该模型的主要成分是一种与胶原蛋白的简单氨基酸结构相似的短肽结构。经分离的蛋白质通过蛋白质印迹法转移至硝化纤维素中。用特异性单克隆抗体进行免疫杂交来检测特殊蛋白质（例如朊病毒模型）的存在，并通过蛋白免疫染色的强度百分比进行定量。过乙酸，当用于被测试的特定配方中时，降低全部蛋白质的数量，产生小肽，其就朊病毒模型的目的而言被认为是无活性的。

ii) 平皿培养法研究

用朊病毒模型悬浮液试验研究过氧乙酸制剂在不同温度和浓度下的作用效果。过氧乙酸配方被配制成过氧乙酸浓度为 1000、1500、和 2000mg/L 的溶液并保持在约 50℃下。每种溶液中加入一份测试蛋白悬浮液，除去样本并进行定量，并将其平皿接种至改性的支原体琼脂。

进行时间杀伤试验来显示时间和过氧乙酸浓度对朊病毒模型的影响。作为实施例，在 50℃下过氧乙酸浓度的影响是明显的（图 3）。在 37℃下孵育 48 小时后，进行平板计数和对数差的计算。图 3 显示在 50℃持续 12 分钟条件下，STERIS 20™ 配方中过氧乙酸浓度的影响作用。在 2000mg/升，6 分钟后，对数值从 9（初始浓度）降至 2。

就这些试验而言，过氧乙酸与 STERIS 20™ 配方中缓冲液联合使用，唯一的区别是其中过氧乙酸的含量不同。

这些结果与采用蛋白印迹法验证的同种 STERIS 20™ 配方可使 vCJD 减少的报道结果相类似 (Antloga 等, 朊病毒疾病和医疗设备, ASAIO J, S69-S72(2000))。这些结构有待在体内进行验证。

b) 苯酚配方研究

LpH™ 是由俄亥俄州门托市的 STERIS 公司出售的一种苯酚的配方。在抗羊迟发性病毒感染的体内试验中，该组合物先前已经被描述为是有效的 (Ernst & Race, *Comparative Analysis of Scrapie Agent Inactivation Methods*, J. Virological Methods, 41, pp. 193-202 (1993))。作者描述该病感染性的丧失依赖于暴露的浓度和时间。例如，在浓度为 0.9% 时，被消除的传染性，当通过对数降低来测定时，在 0.5 小时之后对数为 5 并且在 16 小时时超过对数 7。类似地，在浓度为 9% 时，在 0.5 小时被观测到超过 7 的对数降低。

制品 LpH™ 对测试蛋白样本的活性在其浓度为 5% 时进行检测。结果表明，1 小时的对数减少值为 5.2，3 小时为 5.8。此外，本产品的效力强于另一种同类产品 LpHse™。同样，LpH™ 同 LpHse™ 之间针对朊病毒的差异也已被 Race 所报道 (结果未发表)。

实施例 4：对过氧乙酸处理朊病毒模型样本的优化

利用蛋白降解作为筛选工具的检测显示，在对抗测试蛋白的效力上，优选的过氧乙酸浓度为 2000mg/L 或以上 (图 3)。利用 STERIS 20™ 进行这些试验。

温度对于这些测试蛋白质配方 (用 1000mg/L 过氧乙酸进行研究) 的效果是很明显的。结果初步显示，在该研究测试的时间段，过氧乙酸配方在 50-57℃ 范围能高效地分解蛋白质。温度低于 50℃

几乎观察不到蛋白质分解现象。在约 60℃或更高的温度下，同样可观察到效力的丧失。已经发现温度在 55-57℃左右的效力尤为突出。

实施例 5: MIC 研究

进行了大量针对朊病毒模型的活性物质（许多以前报道可能对朊病毒有效的物质）的 MIC（生长抑制）检测。

下列活性物质对朊病毒模型的生长特性至少显示出某些作用（即，朊病毒模型的生长减慢）：

乳酸链球菌肽（~1000mg/L）

Klenzyme™（5%）（可购自 STERIS 公司）

Renuklenz™（5%）（可购自 STERIS 公司）

NaOH（~0.01N）

HCl（~0.1N）

过氧乙酸（~600mg/L）

新霉素硫酸盐（~125mg/L）

LpH™（可购自 STERIS 公司, Mentor, OH）（1-5%）

LpHse™（可购自 STERIS 公司, Mentor, OH）（1-5%）

锰（~100mg/L）

硝酸银（~30mg/L）

实施例 6: 清除试验

对多种清洁剂进行评价。用牛血清白蛋白（BSA-a protein）污染仪器。为使蛋白质更难去除，将仪器加热至 110℃持续 1 小时导致蛋白质变性。然后将仪器置入自动洗涤器中，用 1 盎司/加仑清洁剂在高温（150℃）下清洗。洗涤程序完成后，肉眼检查残留污染

物。下面按照清除效力排列被评价的清洁剂。所有的产品来自俄亥俄州门托市的 STERIS 公司。

CIP 100TM (以氢氧化钠为基本成分的清洁剂) — 最有效

CIP 150TM (以氢氧化钾为基本成分的清洁剂)

Process KlenzTM

Criti-KlenzTM (中性制品)

CIP 220TM (酸性清洁剂)

水 — 效果最差

以上按照效力的排列也基本与制品碱度(水除外)的排列类似。最有效的清洁制品 CIP 100TM 同样具有最强的碱度。效力最低的 CIP 220TM 为酸性。

当用朊病毒模型替代 BSA 时, 效力的排列顺序相同。

实施例 7: 血红细胞存活试验

朊病毒模型被发现在生长培养基内吸附/利用血红蛋白或血红细胞(RBCs)组分。朊病毒模型对全血红细胞作用的研究得以进行。RBCs 在盐水中清洗 3 次, 重新配成一定浓度, 以便在 Petroff Hauser 下放大 40 倍(40x)计数(~100/视野)。红细胞总数和完整(形态未改变)红细胞百分比在接种了朊病毒模型或水(RBC)或胰酶制剂(Panc-在先前的试验中显示出可溶解血红细胞)后, 随时间进行检测。

如图 4 和 5 所示的结果表明, 与对照组(RBC 和 Panc)比较, 朊病毒模型随时间可导致细胞破坏和溶解。在血红细胞被朊病毒溶解之前有一个延缓期。

实施例 8：时间杀伤试验

先前用朊病毒模型进行了时间杀伤试验。结果以对数数值表示 (log₁₀)，对数值越低，残留的朊病毒越少，因而处理就越有效。

进行时间杀伤试验并显示出在 121℃下盐水溶液中高压灭菌朊病毒模型的效力。在 15 分钟后，朊病毒计数从初始的 8.0 对数值下降至 5.5 对数值。

先前对于重力引流循环 (gravity drain cycle) 在 134℃下持续 1 小时的研究显示出该处理过程是有效的。

进行时间杀伤试验并显示了环氧乙烷在取样管上与朊病毒模型一同处理的效果。取样管暴露于 600mg/L 中持续 18 分钟。

朊病毒对数值	
初始计数	8.5
暴露于 70℃, 100% RH	5.0
暴露于 54℃, 40% RH	4.7

当采用过氧乙酸时，可发现同样的温度影响，环氧乙烷在 54℃下的效力比 70℃时强。

用时间杀伤试验评价了液体杀菌剂/消毒剂的抗朊病毒模型效力。所有产品来自 STERIS 公司。将在悬浮液中的朊病毒模型样本直接加入每种制品中。结果如下所示。

处理方法	暴露时间 (小时)	朊病毒模型的对数值
初始计数	0	~6.6
10% CIP220™	1	>3.0

10% CIP220 TM	3	>3.0
LpH TM	1	1.4
LpH TM	3	0.8

实施例 9：内源性污染研究

对血液制品进行朊病毒污染的筛查。发现以下的污染水平：

马血（1 批）被污染

马血清（1 批）被污染

牛血清（3 批）1 批被污染

羊血（2 批）无污染

结果显示血液制品的朊病毒污染现象是常见的，因此所有即将用于朊病毒相关工作的血液制品在使用之前都应进行筛查。

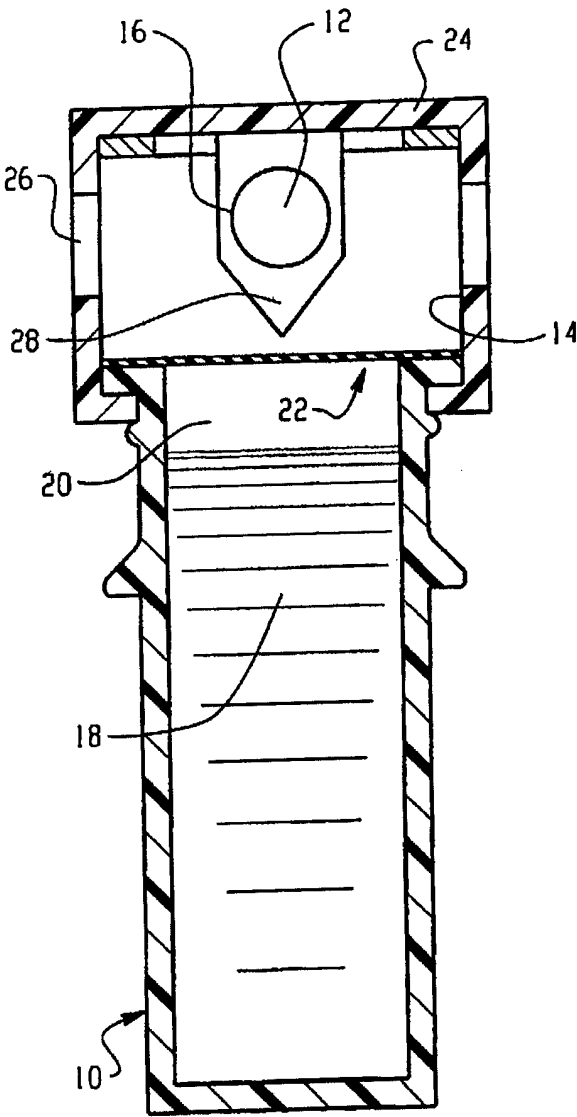


图 1

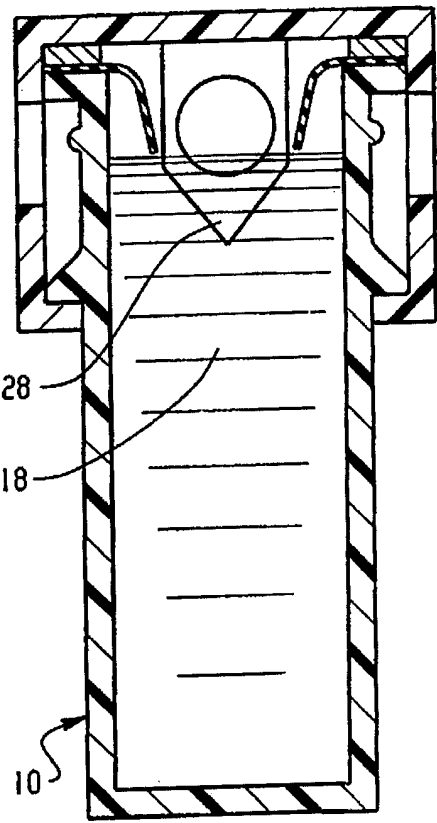


图 2

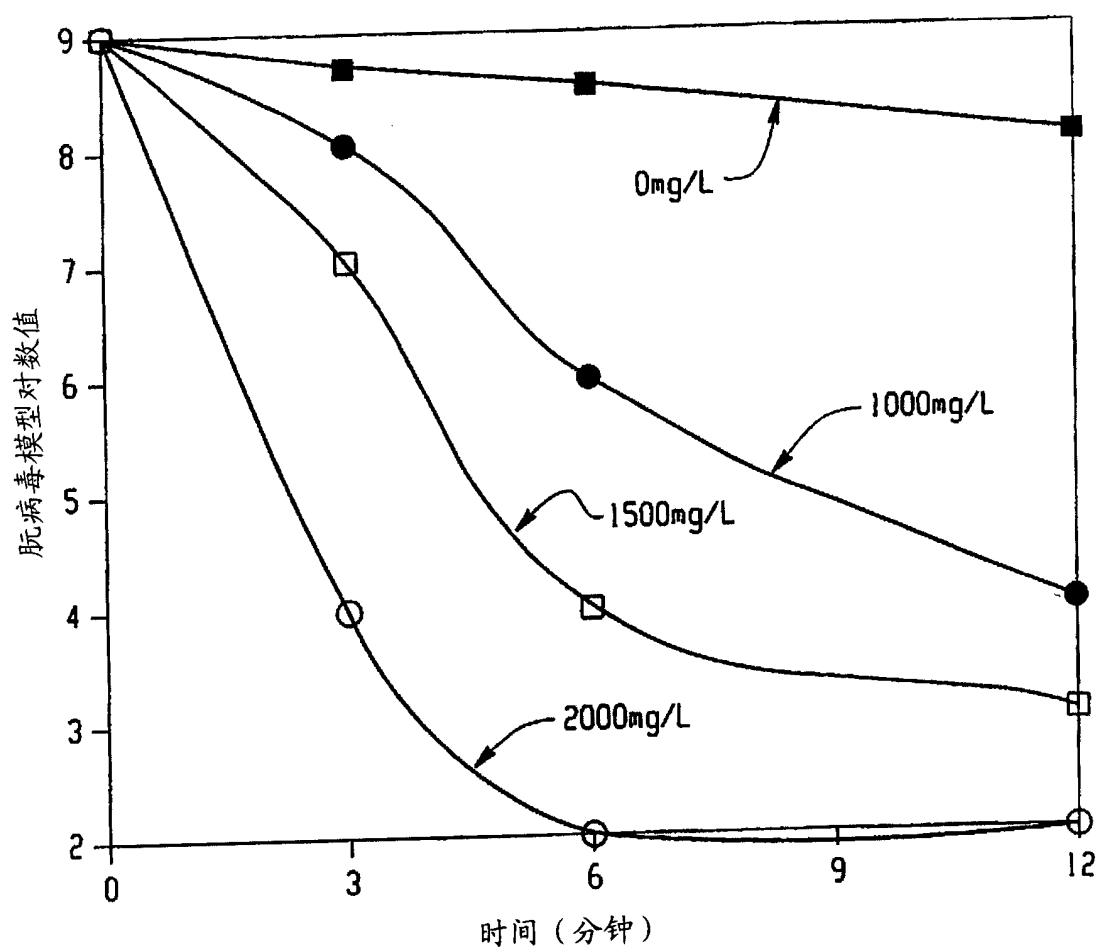


图 3

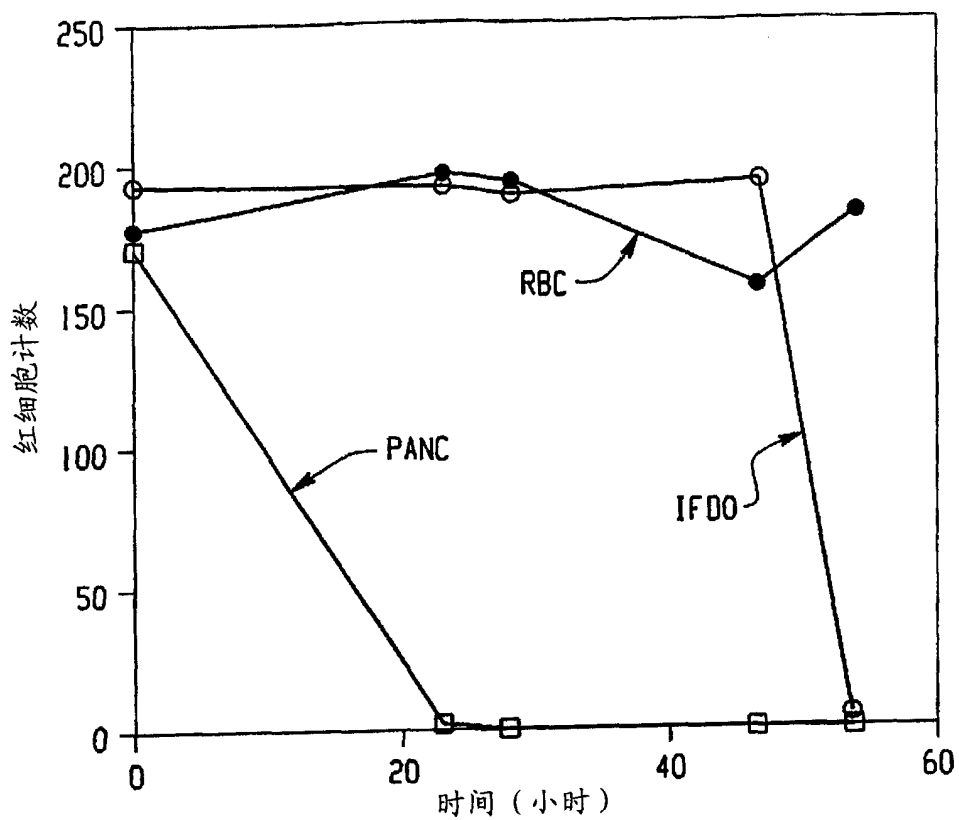


图 4

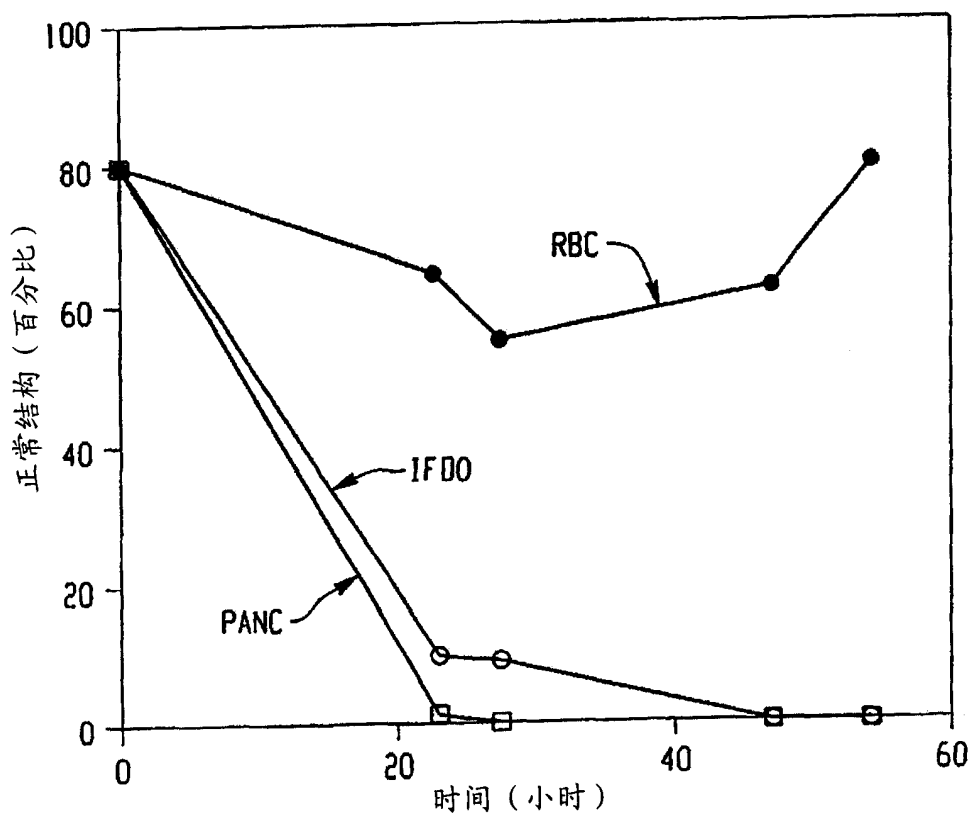


图 5