

申請日期： 91-4-9

案號： 91107068

類別：

A61L 花

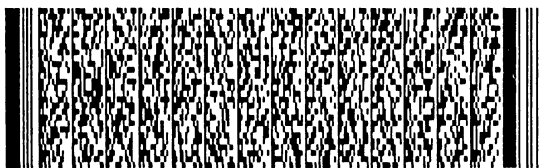
(以上各欄由本局填註)

公告本

發明專利說明書

567074

一、 發明名稱	中 文	用於消滅傳染性普里昂蛋白質之方法
	英 文	Method for destruction of infectious prion protein
二、 發明人	姓 名 (中文)	1. 石家興
	姓 名 (英文)	1. Jason C. H. Shih
	國 籍	1. 美國
	住、居所	1. 美國北卡羅來納州喀里市普蘭特斯伍德巷100號
三、 申請人	姓 名 (名稱) (中文)	1. 百瑞國際公司
	姓 名 (名稱) (英文)	1. BioResource International, Inc.
	國 籍	1. 美國
	住、居所 (事務所)	1. 美國北卡羅來納州勞利市主校區道840號3560室
	代表人 姓 名 (中文)	1. 石全
	代表人 姓 名 (英文)	1. Giles Shih

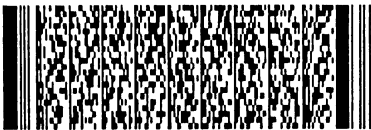


本案已向

國(地區)申請專利	申請日期	案號	主張優先權
美國 US	2001/04/12	09/834, 284	有
美國 US	2001/10/26	10/007, 613	有

有關微生物已寄存於	寄存日期	寄存號碼
-----------	------	------

無



五、發明說明 (1)

發明範疇

概略言之，本發明係有關一種消滅與傳染性海綿樣腦病變(TSE)，例如牛海綿樣腦病變(BSE)以及羊搔癢症有關之傳染性普里昂蛋白質之組成物及方法。更特別是，本發明係關於應用蛋白酶消滅包含於動物組織的傳染性普里昂蛋白質，及/或消毒與滅菌此種傳染性普里昂蛋白質所污染之醫療裝置等物品。

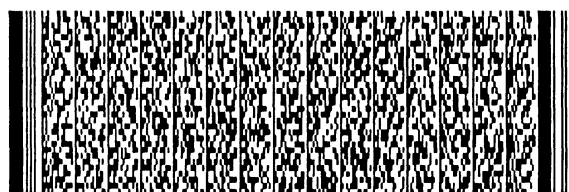
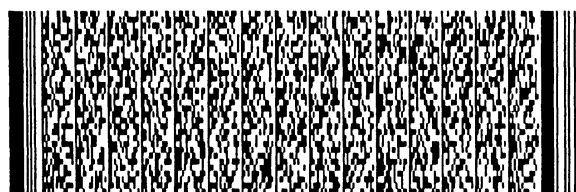
發明背景

普里昂蛋白質是一種構型類似的蛋白質，且普里昂蛋白質引發人類以及非人哺乳類之傳染性神經退化疾病。

非人哺乳類之普里昂疾病包括羊搔癢症(羊)、傳染性貂腦病變(貂)、慢性消耗性疾病(麋鹿、鹿)、牛海綿樣腦病變(BSE)(牛)、貓海綿樣腦病變(貓)、及猴海綿樣腦病變(猴)。

人類有多種神經退化疾病之病因係與普里昂蛋白質有關，包括庫賈氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、吉史席氏症候群(Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome)、致命性失眠、庫魯病(kuru)、以及多種庫賈氏病。人類普里昂疾病之病因係與食用病牛牛肉(感染BSE牛肉，造成新庫賈氏病變種)、投予人類生長技術(造成醫源性庫賈氏病)以及儀式性大麻癮(造成庫魯病)有關。

1992年以來，歐洲已經報導超過180,000個BSE病例以及100個人類庫賈氏病病例，並預測人類病例數目將顯著增加。此種疾病的傳播難以遏止，原因在於庫賈氏病無法治



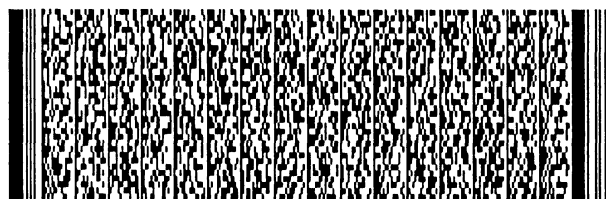
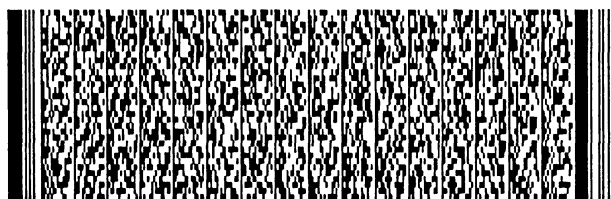
五、發明說明 (2)

癥，其病原普里昂蛋白質頑強且不具免疫原性。普里昂蛋白質之病原以及傳染性同質異形體極為穩定，富含 β -片結構，對熱及常見蛋白質水解酶有抗性(Prusiner, S.B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95, 11363 (1998); Cohen, F.E. and Prusiner, S.B., Ann. Rev. Biochem., 67, 793 (1998); and Pan, K-M, Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 10962 (1993))。

相當大量努力專注集中於研究因牛來源讓BSE及普里昂蛋白質污染人類食物供應源，以及研究於牛的普里昂蛋白質疾病發生及疾病傳播。於牛群的傳染係與對牛群所餵食之飼料有關，該飼料含有衍生自感染牛、羊及其它齧齒類動物的骨粉以及經過精煉器官及組織。

目前，於許多國家中，在其他方面可提供人類食物的動物製品、以及在其他方面可提供原料及動物飼料營養補充物之可實行來源之動物副產品將被焚化，以及將灰燼殘餘物掩埋，以避免來自相關動物中之傳染性普里昂蛋白質存在之普里昂蛋白質傳染的傳播。

於歐洲，已經禁止將得自動物副產品之骨粉做為飼料之用途。於美國，尚無BSE報告被報導，動物業及油精煉業受嚴格法規限制來防止疾病的發作與傳播(Franco, B.A., Feed Stuffs, February 12, 2001)。又，美國禁



五、發明說明 (3)

止肉類及肉類副產品的進口。

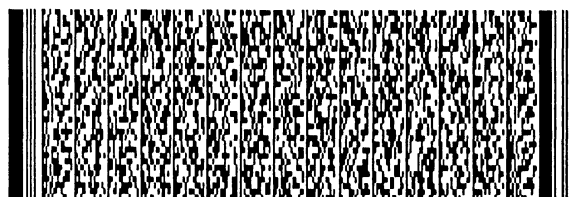
已經開發多種測定動物組織是否存在傳染性普里昂蛋白質之試驗，包括西方墨點試驗、夾置免疫檢定分析、ELISA 試驗、螢光免疫檢定分析試驗、毛細免疫電泳試驗、以及胞質素原結合試驗(Genetic Engineering News, Vol. 21, No. 6, March 15, 2001)，但至今為止尚未發展出產業上可應用的由感染動物組織清除傳染性普里昂蛋白質之方法。

傳染性普里昂蛋白質對於習知消滅方法有抗性，習知消滅方法可變性且以其它方式劣化組態正常蛋白質，習知方法包括高壓滅菌(甚至溫度高達200℃也無法有效去活化傳染性普里昂蛋白質)、沸騰、冰凍、以及暴露於例如甲醛、石炭酸(carbolic acid)及氯仿等試劑。典型地，採用焚化或漂白水處理來消滅普里昂蛋白質之病原性同質異形體。

因此提供一種可消滅傳染性普里昂蛋白質之組成及方法，其適用於處理生物材料，例如包含或污染傳染性普里昂蛋白質之動物組織將構成業界之一大進展。

此外，重覆使用先前已經暴露於已感染普里昂組織之醫療器材所引發之交叉污染風險增高，且可能促成感染的傳播。

於醫護機構使用殺菌劑、消毒劑及滅菌程序來防止受到於醫療照護過程使用的醫療器材之交叉污染係具有關鍵重要性。醫療裝置或器材之消毒及滅菌係使用多種可消滅傳



五、發明說明 (4)

染性生物物質如細菌或病毒之物理及化學方法，而利用多種習知方法達成。例如，可使用化學消毒劑如過乙酸、過氧化氫、氫氧化鈉、甲酸、漂白水、醇類、環氧乙烷、甲醛、福馬林及戊醛等來消毒及滅菌醫療裝置；焚化、高壓滅菌、冷凍、乾燥加熱、沸騰、紫外光及微波照射等也可用來消滅傳統感染劑如細菌及病毒。

但，如前文討論，傳染性普里昂蛋白質已知對習知消滅方法有抗性，因此無法有效消毒或滅菌受普里昂污染的醫療裝置等物品。

因此本發明之另一目的係提供一種可有效消毒或滅菌受普里昂感染之醫療裝置，例如手術器材或如廚具及實驗室器具等物品之組成物及方法。

發明概述

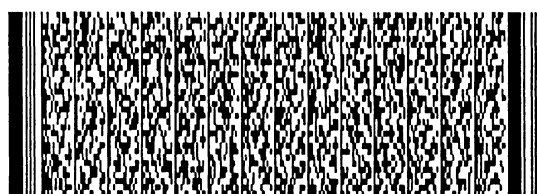
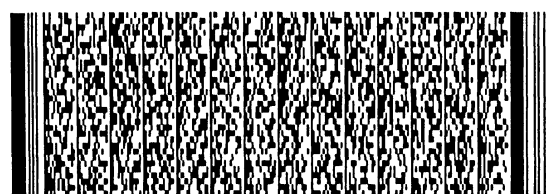
本發明提供一種消滅傳染性普里昂蛋白質之方法及組成物。

一方面，本發明係關於一種於受傳染性普里昂蛋白質污染處減少傳染性普里昂蛋白質之處理方法，該方法包含下列步驟：

(a) 加熱該處至足夠溫度並經歷足夠時間，俾改善於該處之傳染性普里昂蛋白質對蛋白質水解之敏感度；以及

(b) 將加熱之處暴露於蛋白質水解酶，該蛋白質水解酶可有效用於至少部份減少此處之傳染性普里昂蛋白質。

該處可為含有或受傳染性普里昂蛋白質污染的組織、或可能受傳染性普里昂蛋白質污染的物品。

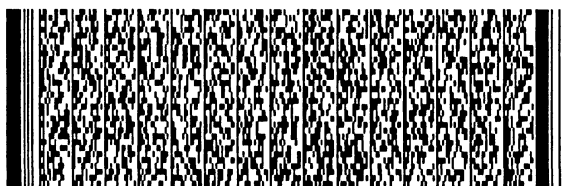
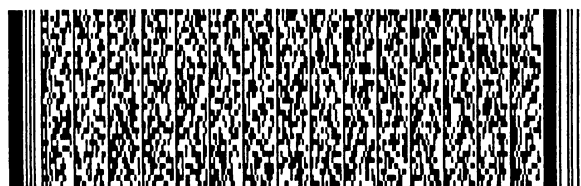


五、發明說明 (5)

步驟(a)之溫度不超過約150℃，且較佳為約100℃至約150℃，及更佳為約125℃至約140℃之範圍。

步驟(b)係於低於步驟(a)之溫度進行，例如於下述溫度範圍進行：(1)約35℃至約100℃，(2)約40℃至約75℃以及(3)約50℃至約60℃。較佳地，步驟(b)係於高於約40℃，或更好高於約50℃之溫度進行。

步驟(b)使用之蛋白質水解酶包括但非限於角蛋白酶類、蛋白酶K、胰蛋白酶類、乳糜胰蛋白酶類、胃蛋白酶類、凝乳蛋白酶類、組織蛋白酶類、枯草桿菌蛋白酶類、彈力蛋白酶類、膠原蛋白酶類、肽內切酶類、肽酶類、寡肽酶、熱分解酶類、桿菌蛋白酶類、菌絲體酶類、羧肽酶類、白胺醯基胺基肽酶類、胺基肽酶類、極嗜熱蛋白酶類、羧基水解酶、木瓜酶、胰酶、鏈基酶、鏈球菌DNA蛋白酶、無花果蛋白酶、羧肽酶、乳糜木瓜酶、以及鳳梨酶。以角蛋白酶及/或其活性片段用於本發明為特佳。角蛋白酶為一組蛋白質水解酶，且一般已知角蛋白酶可分解角蛋白，角蛋白為毛、角、蹄、及毛髮之主要組成。本案發明人發現一項未曾預期且出乎意外的結果，角蛋白酶也可有效消滅傳染性普里昂蛋白質，特別是如果傳染性普里昂蛋白質已經對蛋白質水解敏感時特別容易被消滅。更佳地，此種蛋白質水解酶為苔蘚生成桿菌(*Bacillus licheniformis*)PWD-1角蛋白酶及/或其活性片段。另外，蛋白質水解酶為野生型澱粉液化桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)枯草桿菌蛋白酶突變株，包括一或多



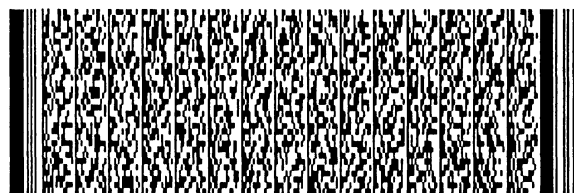
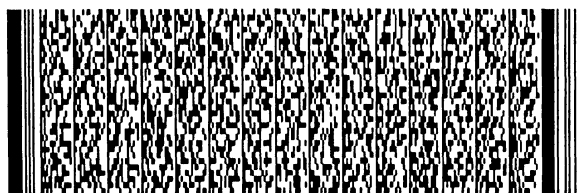
五、發明說明 (6)

個胺基酸取代、添加或刪除。

此外，前述方法進一步包含步驟(c)，測試該處而證實其中的傳染性普里昂蛋白質減少，其包含讓該處接受一種選自西方墨點試驗、夾置免疫檢定分析、ELISA試驗、螢光免疫檢定分析試驗、毛細免疫電泳試驗、以及胞質素原結合試驗組成的組群中之試驗。實施本發明以西方墨點試驗為佳。

本發明之一特別方面係有關一種於污染或懷疑將受傳染性普里昂蛋白質污染之處以減少傳染性普里昂蛋白質之處理方法，說明如前，其中該處包含含有或受傳染性普里昂蛋白質污染之組織。此種組織包含動物組織，較佳為哺乳類組織如牛組織、羊組織等，也可得自動物體任何部位例如腦、攝護腺、腸、肺、心、腎及脾組織。較佳地，此種動物組織包含神經系統組織，更佳包含BSE感染或搔癢症感染組織。可得自傳染性普里昂蛋白質之帶原動物。

本發明之另一特別方面係有關一種如前文說明，於污染或懷疑將受傳染性普里昂蛋白質污染處以減少傳染性普里昂蛋白質之處理方法，其中該處包含懷疑受傳染性普里昂蛋白質污染的物品。此等物品包含手術器材，例如鉗子、鑷子、剪刀、刀子、纜線、衝孔機、小鉗子、套管、卡鉗、雕刻刀、刮匙、剝除器、擴張器、夾子施用器、牽引器、收縮器、挖掘器、針夾持器、抽吸管、凝固電極、腦電波圖深度電極、肋骨及胸骨開闊器、兩極性探針及肋骨夾。另外，此等物品包含餐具及廚具例如刀、叉、剪、削



五、發明說明 (7)

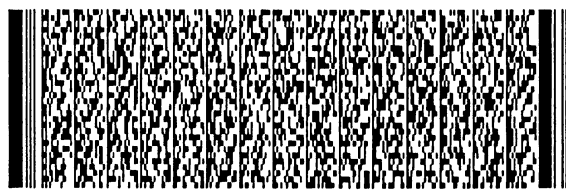
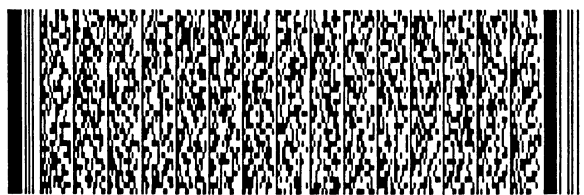
皮刀、削皮器、切片器、刮匙及切肉刀；或實驗室裝置例如容器、過濾器、離心機、光譜儀、及螢光計；或動物用裝置例如夾子、鑷子、刀子、鋸子、探針及電擊裝置。

當欲處理處包含物品時，步驟(b)使用之蛋白質水解酶較好係呈溶液形式提供用以清潔及滅菌物品。雖然角蛋白分解酶可用做為蛋白質水解酶，但此種酶溶液之較佳特徵為具有低有效濃度於約0.2克/升至約1.0克/升之範圍。

本發明之又一方面係有關一種藉蛋白酶水解處理來改良傳染性普里昂蛋白質之分解能力之方法，包含(a)加熱普里昂蛋白質至低於普里昂蛋白質之熱解破壞溫度之溫度，接著為(b)進行普里昂蛋白質之酶催化分解處理。

本發明之又一方面係有關一種由含有或受傳染性普里昂蛋白質污染之牛組織去除傳染性普里昂蛋白質之方法，該方法包括(a)於約100℃至約150℃範圍之溫度烹煮牛組織，接著(b)將牛組織於約35℃至約100℃範圍之溫度暴露於蛋白質水解酶，其中，蛋白質水解酶呈熱安定以及可有效進行蛋白質分解，俾至少部份消滅與牛組織有關的傳染性普里昂蛋白質。烹煮為較佳進行約5分鐘至約5小時時間，步驟(b)使用之蛋白質水解酶較佳包含苔蘚生成桿菌 PWD-1 角蛋白酶。

熱穩定之蛋白質水解酶特別可用於實施本發明。因此，本發明之一特殊方面係有關一種於含有或受傳染性普里昂蛋白質污染之組織中，至少部份分解傳染性普里昂蛋白質之方法，該方法係經由下列步驟：包括於足夠溫度且經歷



五、發明說明 (8)

足夠時間，加熱組織且同時讓組織暴露於熱穩定性蛋白質水解酶，俾至少部份分解傳染性普里昂蛋白質；本發明之另一方面係有關一種組織組成物，包含含有或受傳染性普里昂蛋白質污染之組織以及蛋白質水解酶，該酶於約35℃至約100℃範圍之溫度為熱穩定。較佳地，此種熱穩定性蛋白質水解酶為耐熱性蛋白酶，其可用於足夠溫度下處理動物肉品或副產物以及經歷足夠來消滅其中所含媒介BSE的傳染性普里昂蛋白質之時間。

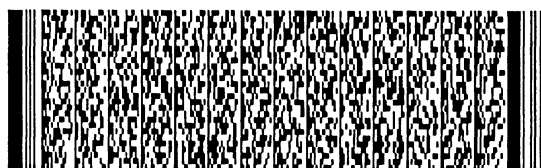
本發明之又另一方面係有關一種用於減少傳染性普里昂蛋白質之組織的處理方法。該方法包含下列步驟：

- (a) 加熱組織至足夠溫度以及經歷足夠時間，俾提升與組織有關之傳染性普里昂蛋白質之蛋白質分解能力；以及
- (b) 將已加熱組織暴露於蛋白質水解酶，該酶可有效用於至少部份減少與此種組織相關的傳染性普里昂蛋白質。

本發明之又一方面係有關一種消毒物品之方法，該物品被懷疑受到傳染性普里昂蛋白質污染，該方法包含下列步驟：

- (a) 加熱該物品至足夠溫度以及經歷足夠時間俾提升物品所含傳染性普里昂蛋白質之蛋白質水解敏感度；以及
- (b) 將已加熱物品暴露於蛋白質水解酶，該酶可有效用於至少部份減少與此種物品相關的傳染性普里昂蛋白質。

又一方面，本發明係有關一種由受傳染性普里昂蛋白質污染之手術器材去除傳染性普里昂蛋白質之方法，該方法包括(a)於約100℃至約150℃範圍之溫度加熱手術器材經



五、發明說明 (9)

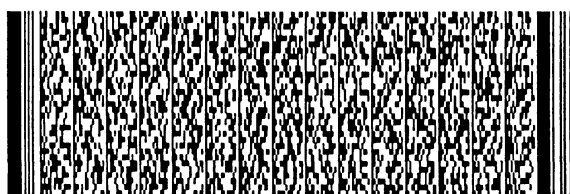
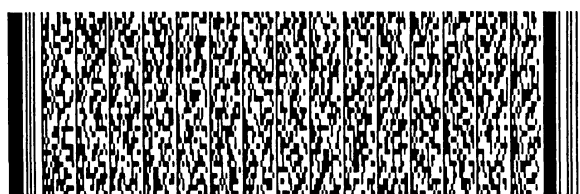
歷約5分鐘至約5小時時間，接著(b)將已加熱之手術器材於約35℃至約100℃範圍之溫度暴露於蛋白質水解酶，於該溫度範圍下，蛋白質水解酶為熱穩定且可有效蛋白質分解而至少部份消滅污染手術器材之傳染性普里昂蛋白質。

本發明之又一方面係有關一種消毒懷疑受傳染性普里昂蛋白質污染物品之清潔組成物，該組成物包含：

(i) 一或多種選自角蛋白酶類、蛋白酶K、胰蛋白酶類、乳糜胰蛋白酶類、胃蛋白酶類、凝乳蛋白酶類、組織蛋白酶類、枯草桿菌蛋白酶類、彈力蛋白酶類、膠原蛋白酶類、肽內切酶類、肽酶類、寡肽酶、熱分解酶類、桿菌蛋白酶類、菌絲體酶類、羧肽酶類、白胺醯基胺基肽酶類、胺基肽酶類、極嗜熱蛋白酶類、羧基水解酶、木瓜酶、胰酶、鏈基酶、鏈球菌DNA蛋白酶、無花果蛋白酶、羧肽酶、乳糜木瓜酶、以及鳳梨酶組成的組群之蛋白質水解酶；以及

(ii) 一種溶劑。

較佳地，本發明之清潔組成物包含角蛋白酶，其濃度係於約0.2克/升至約1.0克/升之範圍。多種溶劑可用於實施本發明，例如蒸餾水、緩衝液、清潔劑溶液、醇、或任何其它常用於酶清潔劑之無機或有機溶劑，此等溶劑無需經過不必要的實驗而可方便由熟諳技藝人士決定。更佳地，清潔組成物進一步包含一或多種提升消毒/滅菌效果之化學添加劑，此等化學添加劑包括但非限於：界面活性劑，助洗劑，加強劑，填充劑及其它佐劑。



五、發明說明 (10)

本發明之其它方面、特色及具體實施例由後文揭示及隨附之申請專利範圍將更為彰顯。

發明之詳細說明及較佳具體實施例

有關本發明及其特點、各方面及具體實施例如後文更完整說明，發明背景乙節引述之技術參考文獻之揭示，以及以下專利及技術參考文獻以引用方式併入此處：

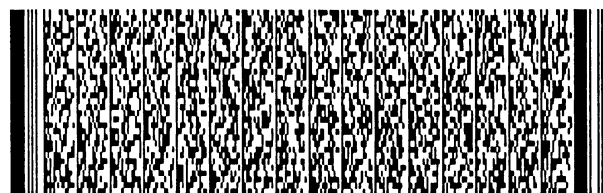
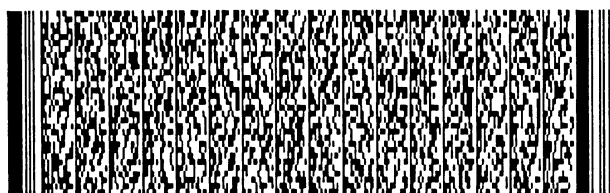
美國專利案：4,908,220；4,959,311；5,063,161；
5,171,682；5,186,961；及5,712,147；

Deslys, J.P., 「Screening slaughtered cattle for BSE」Nature, Vol. 409, pp. 476-477, 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。

本發明係基於蛋白質水解酶用於分解組織之傳染性普里昂蛋白質之用途，或另外，用於消毒或滅菌受普里昂污染物品之用途，該等物品例如手術器材、餐具及廚具、獸醫用器材及實驗室用器材。

本發明方法用於分解傳染性普里昂蛋白質之功效全然出乎意外，因為單獨傳染性普里昂蛋白質暴露於高溫（例如200℃）無法改變其病原性質；此外，習知蛋白質水解酶例如蛋白酶K，可完整消毒非傳染性PrP^c，卻無法消滅相對傳染性同質異形體。因此，高度出乎意外地發現遠低於前述消滅傳染性PrP^{Sc}需要的焚化溫度之溫度可用於進行酶處



五、發明說明 (11)

理，而由含有或受傳染性PrP^{Sc}污染之組織完全清除傳染性PrP^{Sc}。

用於此處，升高溫度表示至少35℃溫度。蛋白質水解敏感度一詞表示傳染性普里昂蛋白質可藉酶催化分解成為非傳染性產物。

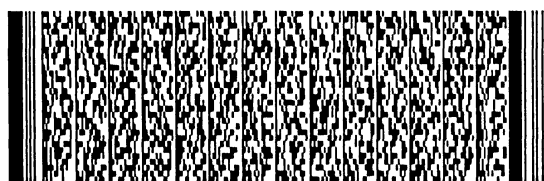
用來減少相關傳染性普里昂蛋白質之例如組織或物品之處的處理可藉後文所述多種技術進行。

例如，本發明之一具體實施例之組織或物品（其含有、受污染、或懷疑含有或受傳染性普里昂蛋白質污染）被加熱至足夠溫度及經歷足夠時間來提升傳染性普里昂蛋白質之蛋白質水解敏感度，可能組合該組織或物品暴露於可有效至少部份消滅任何存在的傳染性普里昂蛋白質之蛋白質水解酶。

此項處理可以二步驟順序進行，包括初步驟，加熱組織或物品至第一較高升溫，以及然後於第二較低升溫暴露已加熱的組織或物品於酶催化劑，俾進行傳染性普里昂蛋白質之蛋白質水解。

於此種二步驟方法中，組織或物品可於第一較高升溫接受加熱處理，然後冷卻至第二較低升溫，例如藉由組織或物品之輻射散熱、組織或物品之對流冷卻、或以其它方式冷卻，讓組織或物品於適當溫度，於該適當溫度下，組織或物品於第二酶處理步驟之蛋白質水解酶共同培育或以其它方式暴露於蛋白質水解酶。

此種二步驟式方法之第二步驟中，組織或物品暴露於蛋



五、發明說明 (12)

白質水解酶，該蛋白質水解酶可有效至少部份消滅組織或物品關聯的傳染性普里昂蛋白質。

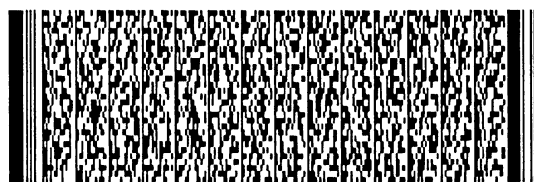
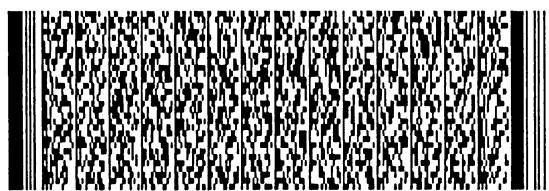
因此該方法可以多種具體實施例進行，其中與組織或物品相關之傳染性普里昂蛋白質之蛋白質水解敏感性係藉將組織或物品加熱至升高溫度提升，隨後接受蛋白質分解處理。加熱步驟之升溫可為任何適當溫度例如至少35℃，至少40℃，至少60℃，至少75℃，及/或不大於150℃(或視需要之其它較低溫度)，特定溫度範圍例如為約100℃至約150℃，及更好為約125℃至約140℃。

另外，本發明之普里昂蛋白質消滅處理可以單步驟程序進行，此時蛋白質水解酶於處理過程使用之溫度為穩定且有效(有效去除傳染性普里昂蛋白質)，因此無需初步加熱步驟。

單步驟式方法中，動物組織或物品連同蛋白質水解酶加熱至傳染性普里昂蛋白質發生酶催化分解之適當溫度。

例如，至少部份分解於含有或受傳染性普里昂蛋白質污染之組織或物品之普里昂蛋白質之方法可經由加熱組織或物品，以及同時將組織或物品於足夠溫度暴露於熱穩定性熱分解酶經歷足夠至少部份分解傳染性普里昂蛋白質之時間而進行。

有關實施本發明採用之方法步驟之特定順序，組織或物品暴露於可有效至少部份消滅相關傳染性普里昂蛋白質之蛋白酶(於二步驟式方法之第二步驟，或於單步驟式方法之酶催化分解步驟)。



五、發明說明 (13)

酶催化分解步驟可於實施本發明之任何適當溫度進行，依據採用之蛋白質水解酶之熱穩定性而定，例如於高於約35℃，高於約40℃或高於約50℃之溫度進行。

舉例說明，酶催化分解步驟依據使用的特定蛋白質水解酶之蛋白質水解安定性以及酶活性而定，可於約35℃至約100℃，約40℃至約100℃，約50℃至約100℃，約40℃至約75℃，或約50℃至約60℃範圍之溫度進行。

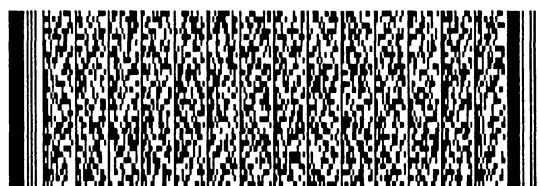
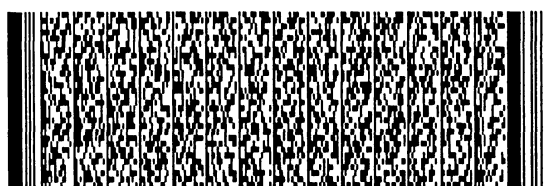
於酶催化分解步驟，蛋白質水解酶至少部份且較佳完全消滅欲處理組織或物品內部或與其它方式關聯的傳染性普里昂蛋白質。

需了解多種蛋白酶之任一者皆可用於實施本發明，特定蛋白質水解酶之選擇將影響蛋白質水解採用來進行蛋白質水解溫度的選擇、以及組織或物品暴露於蛋白質水解酶前之任何升溫處理之選擇。

酶處理之特定溫度處理條件、以及於此種酶處理前之任何升溫初步處理步驟需要的或期望的溫度條件於業界技巧範圍內無需經過不必要的實驗而可由經驗中方便決定。

可用於實施本發明之蛋白質水解酶包括於此使用條件具有酶催化活性且有效之酶。用於升溫酶處理，蛋白質水解酶於使用條件適合為熱穩定性。

就此方面而言，已知具有多種不同熱穩定性之蛋白質水解酶。例如，用於本發明之特定具體實施例之蛋白質水解酶可於35℃，40℃，50℃，60℃或甚至100℃具熱穩定性。



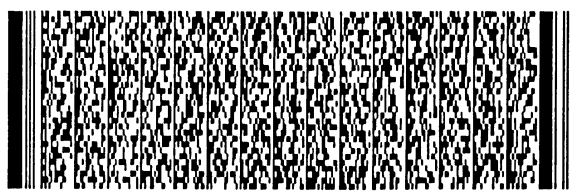
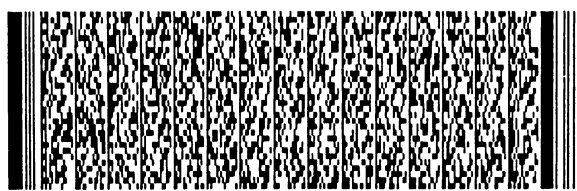
五、發明說明 (14)

外包含酶混合物。酶可以純化或濃縮形式、或另外以稀釋形式使用。較佳酶溶解於溶劑形成濃度為約0.2克/升至約1.0克/升之酶溶液。

於本發明之廣義實務之蛋白質水解酶範例包括，但非限於角蛋白酶類、蛋白酶K、胰蛋白酶類、乳糜胰蛋白酶類、胃蛋白酶類、凝乳蛋白酶類、組織蛋白酶類、枯草桿菌蛋白酶類、彈力蛋白酶類、膠原蛋白酶類、肽內切酶類、肽酶類、寡肽酶、熱分解酶類、桿菌蛋白酶類、菌絲體酶類、羧肽酶類、白胺鹽基胺基肽酶類、胺基肽酶類、極嗜熱蛋白酶類、羧基水解酶、木瓜酶、胰酶、鏈基酶、鏈球菌DNA蛋白酶、無花果蛋白酶、羧肽酶、乳糜木瓜酶、以及鳳梨酶。

較佳酶包括角蛋白酶。特佳角蛋白酶包含苔蘚生成桿菌PWD-1角蛋白酶。可用於實施本發明之蛋白質水解酶包括蛋白質水解酶活性片段，如角蛋白酶如苔蘚生成桿菌PWD-1角蛋白酶活性片段。但，角蛋白酶用於本發明時，酶溶液之有效濃度顯著低於習知酶清潔劑或消毒劑之有效濃度。此外，角蛋白酶之特徵為最理想活性溫度於pH約6.0至約9.5係於約50℃至約65℃之範圍，該溫度顯著高於大部份習知酶清潔劑之最理想溫度。本發明方法之清潔溫度顯著升高，因此可更有效提升手術器材所含傳染性普里昂蛋白質之蛋白質水解敏感度。

本發明之組織處理方法中，接受處理的組織屬於任何適當類型，包括哺乳動物及非哺乳動物組織，甚至實際含有



五、發明說明 (15)

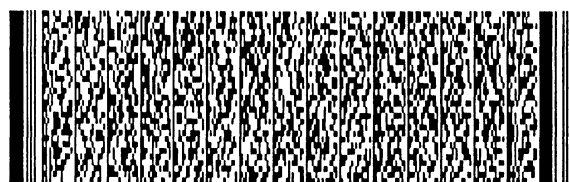
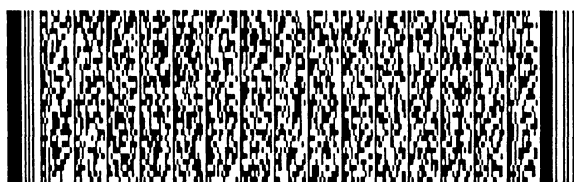
或可能含有傳染性普里昂蛋白質之植物組織。哺乳類組織包括人及非人哺乳類組織。

在一特殊方面中，可接受本發明方法處理之組織包括但非限於牛組織、羊組織、猴組織、以及人組織，且包括多種類型組織例如腦、攝護腺、腸、肺、心、腎、及/或脾組織。一方面，本發明方法用於處理神經系統組織，包括中樞神經系統組織及/或周邊神經系統組織。

根據本發明由組織藉酶催化方式去除傳染性普里昂蛋白質或消毒/滅菌物品如手術器材等之方法進一步包括下述步驟，於蛋白質水解酶處理結束後，試驗組織或物品俾證實相關傳染性普里昂蛋白質已經被消滅。組織或物品進行傳染性普里昂蛋白質試驗可以任一種適當方式且使用任何適當技術或方法進行，例如讓組織或物品接受西方墨點試驗、夾置免疫檢定分析、ELISA試驗、螢光免疫檢定分析試驗、毛細免疫電泳試驗、胞質素原結合試驗，或接受其它可有效測定處理組織是否存在有傳染性普里昂蛋白質之適當試驗。

本發明之酶處理方法可以任何適當方式以處理步驟之任何適當順序進行。

例如，於一具體實施例，欲接受處理組織或物品視需要或期望接受初步非酶熱處理，接著為用以消滅傳染性或污染性普里昂蛋白質之酶處理，接著為清洗以及非酶處理，處理後組織或物品接受試驗，及/或若處理後試驗顯示傳染性普里昂蛋白質由組織或物品之清除不完全，則視需要



五、發明說明 (16)

進行進一步熱/酶處理(以非酶熱處理以及酶升溫處理之交替重覆循環)。

另一具體實施例中，於含有或受傳染性普里昂蛋白質污染之組織或物品，傳染性普里昂蛋白質至少被部份分解，分解步驟包括加熱組織或物品，同時將其暴露於熱穩定蛋白質水解酶，暴露於足夠至少部份分解傳染性普里昂蛋白質之溫度以及經歷足夠時間。然後，已處理之組織或物品進行試驗，以決定傳染性普里昂蛋白質之去除情形。

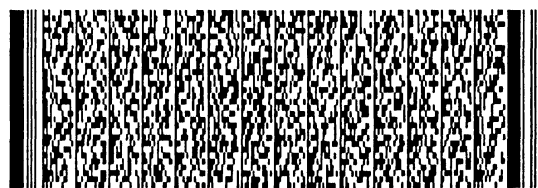
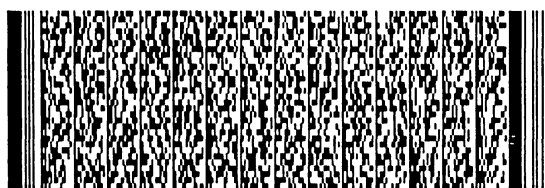
又，本發明方法包括於加熱/酶處理前初步決定欲處理組織或物品是否存在傳染性普里昂蛋白質，因此只對已經介入此測定為含有傳染性普里昂蛋白質之組織或物品施行處理。

另外，熱/酶處理可投予組織或物品，該組織或物品可能含有或受污染，但未事先確定證實存在有傳染性普里昂蛋白質，接著試驗處理產物，決定是否存在有相關任何傳染性普里昂蛋白質。

本發明方法可有效應用於懷疑含有或受媒介TSEs如BSE之傳染性普里昂蛋白質污染之肉品及肉類副產品，俾消滅傳染性普里昂蛋白質。

如此，本發明方法提供一種處理牛及其它動物產物及副產物之可靠辦法，隨後該產物及副產物可於食品加工及/或成形操作進一步加工，而非將該產品或副產品焚化來避免BSE及其它傳染性普里昂蛋白質疾病的傳播。

如此本發明於一具體實施例預期包含一種處理動物產品



五、發明說明 (17)

及副產品之方法，其中普里昂蛋白質初步接受非酶催化加熱處理，例如加熱至低於傳染性普里昂蛋白質之熱解破壞溫度($> > 200^{\circ}\text{C}$)(通常於該溫度進行焚化)，接著為酶催化分解傳染性普里昂蛋白質。

本發明之特定具體實施例中，傳染性普里昂蛋白質由含該蛋白質之牛組織去除，去除方式係將牛組織於約 100°C 至約 150°C 溫度烹煮約5分鐘至約5小時時間，接著將牛組織於約 35°C 至約 100°C 溫度暴露於蛋白質水解酶，蛋白質水解酶於該溫度具有熱穩定性但可有效將蛋白質分解而消滅牛組織的傳染性普里昂蛋白質。

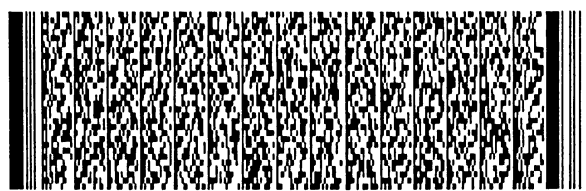
烹煮處理可於可適當維持升溫條件下且於適當腔室或容器內進行，可視需要控制壓力而於烹煮操作提供期望的大氣壓、次大氣壓或超大氣壓。

烹煮後，牛組織使用苔蘚生成桿菌PWD-1角蛋白酶來接受蛋白質分解處理而消滅其中所含傳染性普里昂蛋白質。於熱/酶處理後，組織可藉任何適當方式加工處理。

例如，此種牛組織經試驗或檢定分析證實完全消滅傳染性普里昂蛋白質後，牛組織可經加工處理而獲得動物飼料成份(例如肉骨粉)或飼料補充物。

特佳方法具體實施例中，烹煮步驟係於約 125°C 至約 150°C 之第一升溫範圍進行，隨後牛組織之酶處理步驟係使用苔蘚生成桿菌PWD-1角蛋白酶於約 40°C 至約 60°C 之第二升溫範圍進行。

本發明方法允許處理後牛肉副產物獲得利用，否則(於



五、發明說明 (18)

懷疑或證實存在有傳染性普里昂蛋白質的情況下)該等肉品需被焚化與拋棄。

本發明方法可獲得業界之一大進展，允許若未經處理將構成生物危害的材料用於營養用途。同時本發明方法可避免焚化以及拋棄感染或污染動物組織之成本以及資本投資需求。

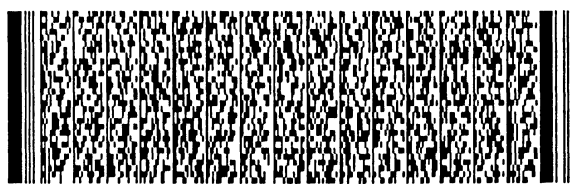
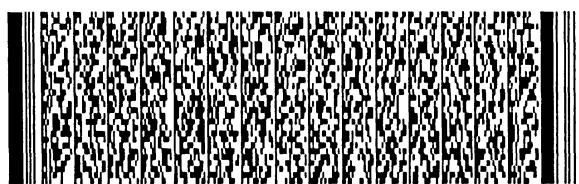
本發明具體實施由組織去除傳染性普里昂蛋白質例如媒介BSE之普里昂蛋白質之簡單方法，本發明方法係經由將組織暴露於熱穩定性蛋白質水解酶，於足夠溫度且經歷足夠時間足以由組織至少部份清除傳染性普里昂蛋白質。

本發明方法可廣義應用於消滅傳染性普里昂蛋白質，該蛋白質可傳染傳染性海綿樣腦病變(TSE)及/或其它普里昂蛋白質媒介疾病，包括但非限於牛海綿樣腦病變(BSE)及羊搔癢症。

本發明方法可應用於處理供人類食用之動物肉品、以及處理供動物飼料或動物飼料成份用之動物副產物。

於一組成物方面，本發明包含一種組織組成物，其包括(i)含有傳染性普里昂蛋白質例如媒介BSE之普里昂蛋白質之組織如牛組織，以及(ii)於酶處理採用之溫度範圍，例如約40℃至約60℃為熱穩定性之蛋白質水解酶如苔蘚生成桿菌PWD-1角蛋白酶。

此種組織組成物可於升高溫度。組成物於適當升高溫度具有酶反應性，用以製造包括蛋白質水解酶以及不含傳染性普里昂蛋白質之處理後組織之產物組成物。



五、發明說明 (19)

性普里昂蛋白質之處理後組織之產物組成物。

雖然於前文舉例說明中，本發明主要係應用於處理收穫狀態之感染或污染動物組織，例如提取出用於隨後製造動物飼料成份之動物部份，但本發明也包含施用蛋白質水解酶於活體內治療普里昂疾病。

一具體實施例中，提供一種治療性組成物用於活體內普里昂疾病治療，包括一種可有效對抗普里昂疾病之蛋白質水解酶做為活性成份。

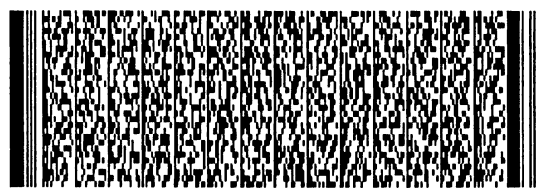
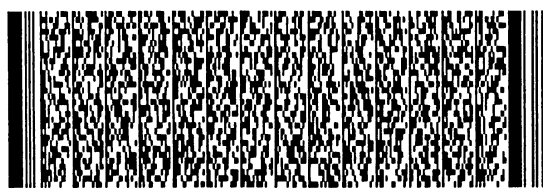
另一具體實施例包括治療性組成物，其含有角蛋白酶與非傳染性普里昂蛋白質(例如PrP^c，或PrP^{Sc}其已經經過改性而變成非傳染性，或PrP^{Sc}之非傳染性片段)組合做為活體內傳染性普里昂蛋白質之分子辨識蛋白質。

又另一種治療性組成物包括角蛋白酶或其它蛋白酶於載體之構成體或組合。

另一治療性組成物包括熱原劑例如無毒改性類毒素類似物與蛋白質水解酶之組合，該組合於活體內誘發發燒時可對抗普里昂疾病。

本發明也包含活體內治療性組成物，包含一種聚核苷酸序列，其包括第一區，第一區編碼製造蛋白質水解酶或其活性片段，以及第二區，第二區編碼熱原肽做為重組聚核苷酸表現載體之一部份。轉移感染後，耐熱蛋白質水解酶或其活性片段，及熱原肽之活體內表現，可有效用於傳染性普里昂蛋白質對抗作用。

至於又另一實施例，治療性組成物調配血腦障穿透劑例



五、發明說明 (20)

染性海綿樣腦病變。此種組成物包含治療性化合物例如角蛋白酶或其它蛋白質水解酶或其活性片段軛合至寡聚物，其中該寡聚物包含親脂部份耦合至親水部份。可用於調配此種治療性組成物之寡聚物更完整說明於2000年2月24日公告之國際公告案WO 00/09073。

本發明方法之另一主要用途係用於物品之消毒及/或滅菌，此等物品例如手術器材、餐具、廚具、實驗室裝置及實驗室器具。此種方法可廣義應用於消滅下列物品相關之普里昂蛋白質污染物：

(a) 手術器材，例如鉗子、鑷子、剪刀、刀子、纜線、衝孔機、小鉗子、套管、卡鉗、雕刻刀、刮匙、剝除器、擴張器、夾子施用器、牽引器、收縮器、挖掘器、針夾持器、抽吸管、凝固電極、腦電波圖深度電極、肋骨及胸骨開闢器、兩極性探針及肋骨夾等；

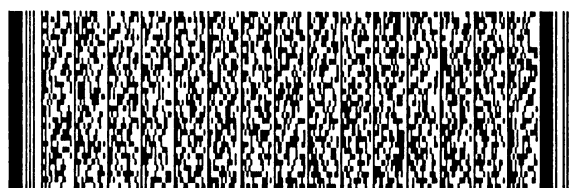
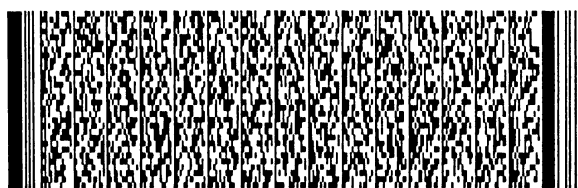
(b) 餐具及廚具例如刀、叉、剪、削皮刀、削皮器、切片器、刮匙及切肉刀；及

(c) 實驗室器具例如過濾器、離心機、光譜儀、螢光計及多種容器以及

(d) 獸醫用器具及裝置，例如夾子、鑷子、刀子、鋸子、探針及電擊裝置。

上表僅供舉例說明本發明之若干用途，而非視為圍限本發明之範圍。

下表顯示根據本發明之一具體實施例之消毒/滅菌週期：



五、發明說明 (21)

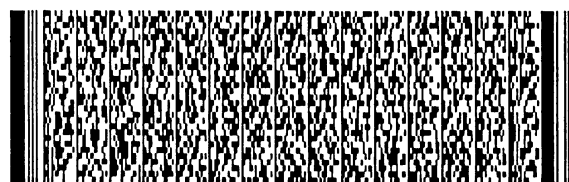
表 I

步 驟	溫 度	時 間
預 洗 (冷 水)	室 溫	2-5 分 鐘
加 熱	35-100 °C	20-40 分 鐘
冷 卻	34-51 °C	2-10 分 鐘
酶 洗 滌	34-51 °C	20-120 分 鐘
超 音 波 處 理	34-51 °C	5 分 鐘
清 潔 劑 洗 滌	51-57 °C	2-5 分 鐘
清 洗 與 乾 燥	室 溫	5 分 鐘
高 壓 供 滅 菌	200-500 °C	---

另一具體實施例中，熱穩定性蛋白質水解酶用於此種消毒/滅菌過程，故可同時進行加熱及酶洗滌步驟，此步驟係於足夠溫度並經歷足夠時間，俾足以完全消滅傳染性普里昂蛋白質以及滅菌接受處理的物品。

於一組成物方面，本發明涵蓋一種清潔組成物，其包括(i)蛋白質水解酶，例如苔蘚生成桿菌PWD-1角蛋白酶，該酶於酶處理採用之溫度範圍例如約40 °C至約60 °C為熱安定；以及(ii)一種溶劑。

任一種適合用於酵素清潔劑之溶劑皆可用於本發明組成物。由於蒸餾水與生物相容且成本低，故以蒸餾水為較佳溶劑。其它習知無機及有機溶劑如醇、緩衝溶液、清潔劑溶液也可用於實施本發明，且熟諳技藝人士方便選擇與採用的特定的酶相容之溶劑。習用化學添加劑也可加入本發明之清潔組成物，添加劑包括但非限於界面活性劑、助洗



五、發明說明 (22)

劑、加強劑、填充劑及其它佐劑。

本發明之清潔組成物即使於極低濃度，例如低於0.3克/升仍然保有其消滅傳染性普里昂蛋白質之效果。當角蛋白酶用於此種清潔組成物時，此種組成物之酶濃度較佳係於約0.2克/升至約1.0克/升之範圍。

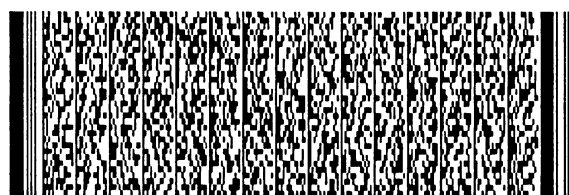
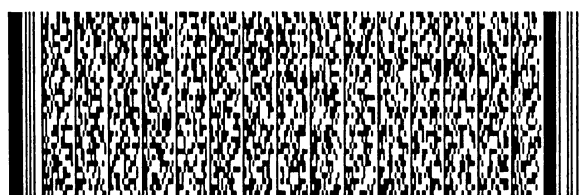
本發明之清潔組成物於升溫具有酶催化反應性，因此可於升溫用於完全摧毀手術器材、餐具、廚具、獸醫用器材、及實驗室器具所帶有的傳染性普里昂蛋白質。

本發明之特色及優點經由參照下列說明例將更完整顯示。

實施例1

本實施例採用可分解毛之細菌，亦即苔蘚生成桿菌種系PWD-1，該菌種係由家禽廢物之嗜熱無氧消化分解器(參考C.M. Williams and J.C.H. Shih, J. Appl. Bacteriol. 67, 25 (1989); J.C.H. Shih, Poultry Sci. 72, 1617 (1993))並可作為角蛋白酶來源(參考X. Lin, C.G. Lee, E.S. Casale, and J.C.H. Shih, Appl. Environ. Microbiol. 58, 3271 (1992))。

該角蛋白酶編碼基因(參考X. Lin, D.W. Kelemen, E.S. Miller and J.C.H. Shih, Appl. Env. Microbiol. 61, 1469 (1995))經過分離及定序，也已經完成此種酶之產量擴充發酵製造(參考J.J. Wang and J.C.H. Shih, J. Ind. Microb. Biotech. 22, 608 (1999))。此種酶為絲胺酸蛋白酶。



五、發明說明 (23)

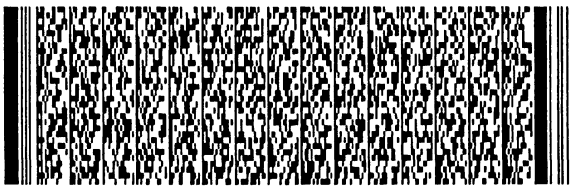
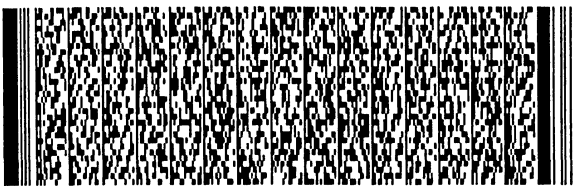
胺酸蛋白酶。

此種角蛋白酶之粗製劑以及純製劑係如前述製造(參考 X. Lin, C.G. Lee, E.S. Casale, and J.C.H. Shih, Appl. Environ. Microbiol. 58, 3271 (1992) 及 J.J. Wang and J.C.H. Shih, J. Ind. Microb. Biotech. 22, 608 (1999)), 係由北卡羅萊納州立大學之發酵廠, 北卡州芮雷(NCSU)獲得。角蛋白酶用於PrP之效果之試驗係於荷蘭賴芮司德(ID-賴芮司德)動物科學衛生研究所進行。

純化後之角蛋白酶與其它蛋白酶包括彈力蛋白酶、膠原蛋白酶、蛋白酶K及胰蛋白酶(全部皆得自西格瑪化學公司)比較有關對各種基質的反應。角蛋白、彈力蛋白、及膠原蛋白之水解反應係藉遞增自由態胺基之^{Trp}三酮(ninhydrin)比色反應(A₄₅₀)測量(參考X. Lin, C.G. Lee, E.S. Casale, and J.C.H. Shih, Appl. Environ. Microbiol. 58, 3271 (1992))。自由態白胺酸用做為標準品來計算自由態胺基當量。由上清液之A₂₈₀增加來測量酪蛋白水解(參考Price and Johnson, 1989)。結果示於下表1。對各特定酶基質, 測定全部蛋白酶之相對活性。累進反應性活性(CRA)證實角蛋白酶有多種基質且具有高度活性。

表1. 蛋白酶對不同基質之相對比活性^a

基質	角蛋白 酶	彈力蛋 白酶	膠原蛋 白酶	蛋白酶K	蛋白酶
----	----------	-----------	-----------	------	-----



五、發明說明 (24)

彈力蛋白 ^b	2.52	1.00	0.43	0.57	0.61
膠原蛋白 ^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 全部酶活性係於其各別之最理想條件測量與比較。

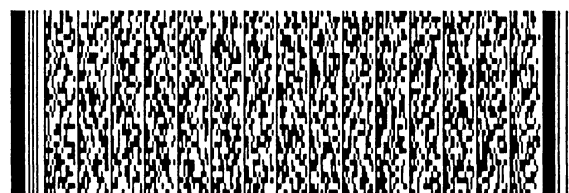
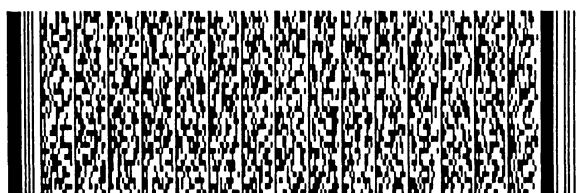
^b 蛋白質分解作用係藉茚三酮反應測量(Lin et al., 1992)。

^c 蛋白質水解係藉可溶性A₂₈₀增高測量(Price 及 Johnson, 1989)。

^d 累進相對活性。

角蛋白酶對病原性PrP效果試驗係於分子辨識實驗室分離廠，ID-賴芮司德進行。採用普里昂尼克檢查(Prionics Check)(普里昂尼克公司，蘇黎世)之歐盟認證程序來檢測病原性PrP。普里昂尼克檢查程序係基於西方墨點技術，採用6H4單株抗體來觀察PrP之特定形式(普里昂尼克公司，羊之BSE-普里昂檢測試驗，使用產品資訊，蘇黎世(2000年))。

為了模擬肉骨粉製程，對原先程序做修改。首先，標準程序之蛋白酶K以角蛋白酶替代。使用角蛋白酶粗製劑。其次，試驗預先烹煮BSE組織的效果。使用微爾肯(Vulcain)壓力鍋於115℃烹煮均化組織40分鐘。第三，也試驗抗氧化劑亞硫酸鈉(Na₂SO₃)。其餘程序同製造商使用產品資訊所述(普里昂尼克公司，羊之BSE-普里昂檢測試驗，使用產品資訊，蘇黎世(2000年))。



五、發明說明 (25)

驗，使用產品資訊，蘇黎世(2000年))。

採用下述方案。1克BSE-陽性腦組織於9毫升普里昂尼克緩衝液混合及均化。其中半份，5毫升，添加亞硫酸鈉獲得終濃度0.1%，另外半份，不含亞硫酸鈉。各份分布於可接受高壓加熱的4×2.0毫升費爾肯(Falcon)管。又使用1.0毫升做為陽性對照，藉標準普里昂尼克程序處理；又另一1.0毫升做為無角蛋白酶之對照。二根試管分別含及未含亞硫酸鈉加壓烹煮40分鐘，另外二根試管未經烹煮。於PCR平板之孔內，各150微升樣品於50℃接受角蛋白酶(150微克，1,000 EU/毫克)處理0時或4小時。角蛋白酶預先溶解於磷酸鹽緩衝液0.05M，pH 7.5。反應藉加入普里昂尼克派非布萊克(Pefabloc)(此乃一種絲胺酸蛋白酶抑制劑)終止。酶培育結束時，各10微升樣本混合物載於SDS-PAGE凝膠，遵照普里昂尼克電泳、西方墨點及免疫化學發光檢測程序。

本實驗結果顯示於圖1(角蛋白酶對BSE-普里昂蛋白分解效果)，其中線道1-17如後：

線道1：單獨緩衝液。

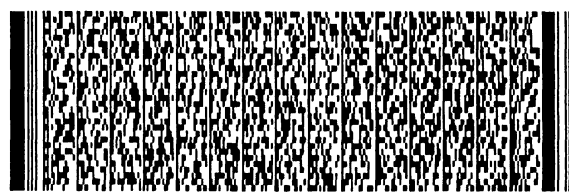
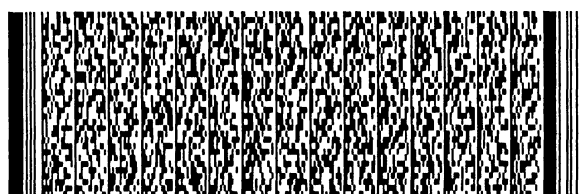
線道2：接受試驗之BSE-腦組織。

線道3：與亞硫酸鈉共同預烹煮，於0時停止角蛋白酶。

線道4：同線道3，但角蛋白酶消化4小時。

線道5：不含亞硫酸鈉經預先烹煮，於0時終止角蛋白酶。

線道6：同線道5，但角蛋白酶消化4小時。



五、發明說明 (26)

線道7: 未經預先烹煮, 含亞硫酸鈉, 角蛋白酶0時。

線道8: 同線道7, 但角蛋白酶消化4小時。

線道9: 未經預先烹煮, 不含亞硫酸鈉, 角蛋白酶0時。

線道10: 同線道9, 但角蛋白酶消化4小時。

線道11: 未經預先烹煮, 含亞硫酸鈉, 無角蛋白酶。

線道12: 同線道11, 但培育4小時(註: 角蛋白酶係偶然添加)。

線道13: 經純化之搔癢症PrP, 含亞硫酸鈉, 角蛋白酶於0時被終止。

線道14: 同線道13, 但角蛋白酶消化4小時。

線道15: 經純化之羊搔癢症PrP, 含亞硫酸鈉, 不含角蛋白酶。

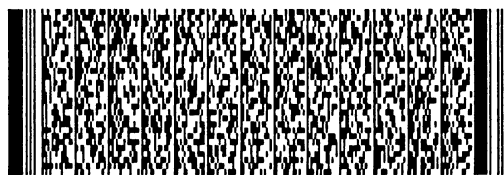
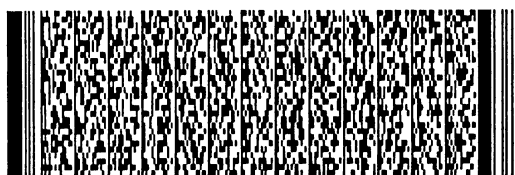
線道16: 同線道15, 但培育4小時。

線道17: PrP標準品。

如圖1所示, 角蛋白酶對於傳染性PrP之消化效果顯著, 特別當樣品於115℃預烹煮40分鐘(線道3-6)時特別顯著。未經預先烹煮(線道7-10), 角蛋白酶較為無效, 但角蛋白酶仍然可分解大於半量傳染性PrP陽性物質。發現角蛋白酶用於經純化之羊搔癢症PrP也具有活性(線道13-16)。存在有亞硫酸鈉無論單獨或含角蛋白酶皆未造成重大差異(線道15-16)。線道12樣品係偶然添加角蛋白酶, 故因此為陽性反應。

實施例2

根據下述實驗程序進行實驗, 進一步證實本發明之功



五、發明說明 (27)

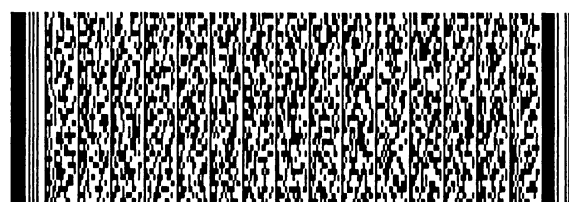
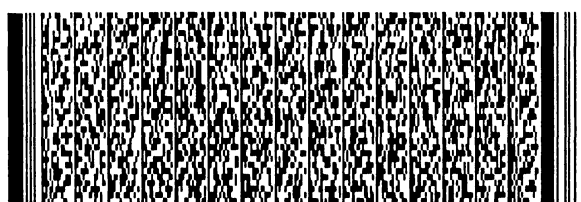
效：

PWD-1 角蛋白酶為衍生自苔蘚生成桿菌種系PWD-1 之絲胺酸蛋白酶，其用於受感染的牛及羊腦幹組織執行PrP^{Sc}之分解。使用普里昂尼克檢查試驗(普里昂尼克公司，瑞士蘇黎世)用來測定樣品之PrP^{Sc}，組織樣品預先烹煮後，使用經純化之PWD-1 角蛋白酶做為消化酶消化組織樣品。

一例中，1 克BSE 陽性腦幹組織與9 毫升普里昂尼克均化緩衝液混合以及均化，接著使用維爾克高壓鍋於115 °C 高壓烹煮40 分鐘。於96 孔平板各加入150 毫升樣品，使用預先溶解於磷酸鹽緩衝液，0.05M，pH7.5 之PWD-1 角蛋白酶處理。使用酶濃度250 微克/毫升。於50 °C 進行酶消化60 分鐘。藉加入15 微升皮法布朗克絲胺酸蛋白酶抑制劑中酶反應。0 時樣品於添加PWD-1 角蛋白酶前首先加入抑制劑處理。酶培育結束時，各10 微升樣品載於SDS-PAGE 之凝膠。如普里昂尼克檢查套件組摘述程序進行電泳、西方墨點及免疫化學發光檢測。

腦幹組織樣品，3 個BSE- 陽性(樣品B1，B2，B3)，1 個陰性(牛樣品N)，2 個羊搔癢症陽性(樣品S1 及S2) 以及1 個陰性(羊樣品N) 相對於對照組利用純化後之PWD-1 角蛋白酶進行試驗。

圖2 顯示試驗結果，左側(「經角蛋白酶處理」)為角蛋白酶消化結果。右側(「對照」)為標準普里昂尼克檢查結果。角蛋白酶可水解全部接受試驗之PrP^{Sc}、^{BSE}(線道3-5) 及羊搔癢症(線道8 及9)。



五、發明說明 (28)

圖2證實當樣品係藉本發明之熱與酶組合處理時，可完全消滅含傳染性普里昂蛋白質之牛組織樣品(樣品B1，B2，B3)以及含該蛋白質之羊樣品(樣品S1及S2)之傳染性普里昂蛋白質。

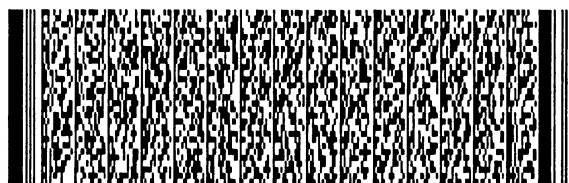
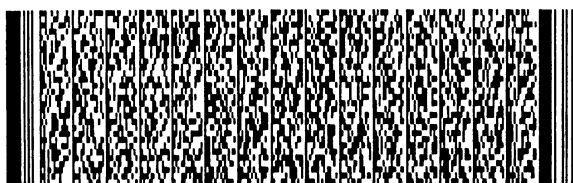
結果證實角蛋白酶具有分解各類接受試驗蛋白質之多樣性效果。角蛋白酶用於BSE，PrP之功效試驗中，結果為陽性，當BSE腦組織樣品經過預先烹煮時，結果特別呈陽性。此乃首次試驗證實病原性PrP可藉酶分解。

於約125℃溫度加壓烹煮為將動物副產品加工成為肉骨粉的例行步驟。根據本發明使用角蛋白酶進行後烹煮，用以摧毀傳染性PrP，提供一種控制BSE傳播的有效方法。經過角蛋白酶處理之肉骨粉經試驗證實不含PrP，因此肉骨粉可回收供飼料用。

如此本發明方法提供簡單而有用之動物產品及副產品加工處理之酶催化處理方法。

雖然此處已經參照各特色、特點及具體實施例說明本發明，但需了解本發明之用途非僅囿限於此，反而擴充涵蓋熟諳技藝人士顯然自明之多種其它變化、修改及其它具體實施例。

如此，需了解本發明須廣義解釋為涵括於後文申請專利範圍界定之本發明精髓及範圍內之全部此等變化、修改及其它具體實施例。



圖式簡單說明

圖1及2說明於SDS-PAGE凝膠上進行凝膠電泳/西方墨點分析結果，證實用於消滅傳染性普里昂蛋白質之本發明方法的效果。

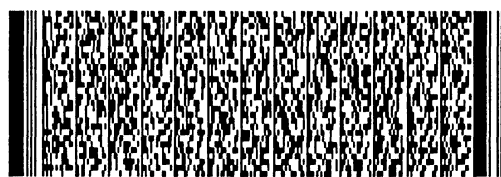
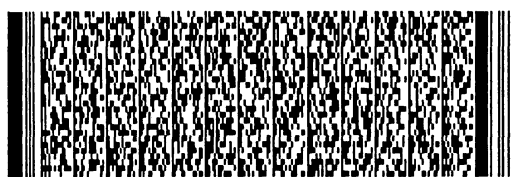


四、中文發明摘要 (發明之名稱：用於消滅傳染性普里昂蛋白質之方法)

一種使用普里昂(prion)消滅性蛋白酶藉熱/酶催化處理傳染性普里昂蛋白質而消滅傳染性普里昂蛋白質之方法及組成物，傳染性普里昂蛋白質可能與傳染性海綿樣腦病變(TSE)及/或其它普里昂蛋白質媒介疾病有關。該方法及組成物適用於處理含有或受傳染性普里昂蛋白質種系污染之組織，或消毒或滅菌受普里昂污染之物品，例如手術器材、廚具、實驗室器具等。

英文發明摘要 (發明之名稱：Method for destruction of infectious prion protein)

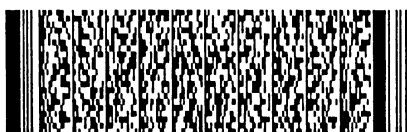
A method and composition for destruction of infectious prion proteins associated with transmissible spongiform encephalopathy (TSE) and/or other prion protein-mediated diseases, by thermal/enzymatic treatment of the infectious prion proteins with a prion-destructive protease. The method and composition are applicable to treatment of tissue containing or contaminated with infectious prion protein strains, or disinfection or sterilization of prion-



四、中文發明摘要 (發明之名稱：用於消滅傳染性普里昂蛋白質之方法)

英文發明摘要 (發明之名稱：Method for destruction of infectious prion protein)

contaminated articles, such as surgical instruments, kitchen utensils, laboratory tools, etc.



六、申請專利範圍

1. 一種用於在受污染或懷疑受傳染性普里昂蛋白質污染處減少傳染性普里昂蛋白質之處理方法，該方法包含下列步驟：

(a) 加熱該處至足夠溫度並經歷足夠時間，俾改善於該處之傳染性普里昂蛋白質對蛋白質水解之敏感度；以及

(b) 將已加熱之處暴露於蛋白質水解酶，該蛋白質水解酶可有效用於至少部份減少此處之傳染性普里昂蛋白質。

2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，步驟(a)之溫度包含超過約150℃溫度。

3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，步驟(a)之溫度包含約100℃至約150℃範圍之溫度。

4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，步驟(a)之溫度包含約125℃至約140℃範圍之溫度。

5. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，步驟(b)係於約35℃至約100℃範圍之溫度進行。

6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，步驟(b)係於高於約40℃之溫度進行。

7. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，步驟(b)係於高於約50℃之溫度進行。

8. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，步驟(b)係於低於步驟(a)溫度之溫度進行。

9. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，步驟(b)係於約40℃至約75℃範圍之溫度進行。

10. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，步驟(b)係於



六、申請專利範圍

約50℃至約60℃範圍之溫度進行。

11. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，該蛋白質水解酶包含一種選自角蛋白酶類、蛋白酶K、胰蛋白酶類、乳糜胰蛋白酶類、胃蛋白酶類、凝乳蛋白酶類、組織蛋白酶類、枯草桿菌蛋白酶類、彈力蛋白酶類、膠原蛋白酶類、肽內切酶類、肽酶類、寡肽酶、熱分解酶類、桿菌蛋白酶類、菌絲體酶類、羧肽酶類、白胺醯基胺基肽酶類、胺基肽酶類、極嗜熱蛋白酶類、羧基水解酶、木瓜酶、胰酶、鏈基酶、鏈球菌DNA蛋白酶、無花果蛋白酶、羧肽酶、乳糜木瓜酶、以及鳳梨酶組成的組群之酶。

12. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，該蛋白質水解酶包含角蛋白酶及/或其活性片段。

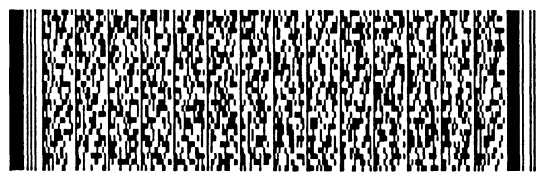
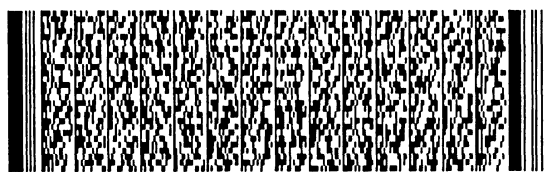
13. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，該蛋白質水解酶包含苔蘚生成桿菌(*Bacillus Licheniformis*)PWD-1酶及/或其活性片段。

14. 如申請專利範圍第1項之方法，進一步包含步驟(c)，係試驗該處，俾證實傳染性普里昂蛋白質的減少。

15. 如申請專利範圍第14項之方法，其中，試驗步驟(c)包含讓該處接受一種選自西方墨點試驗、夾置免疫檢定分析、ELISA試驗、螢光免疫檢定分析試驗、毛細免疫電泳試驗、以及胞質素原結合試驗組成的組群之試驗。

16. 如申請專利範圍第14項之方法，其中，試驗步驟(c)包含讓該處接受西方墨點試驗。

17. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，該處包含含有



六、申請專利範圍

或受傳染性普里昂蛋白質污染之組織。

18. 如申請專利範圍第17項之方法，其中，該組織包含哺乳類組織。

19. 如申請專利範圍第17項之方法，其中，該組織包含神經系統組織。

20. 如申請專利範圍第17項之方法，其中，該組織包含牛組織。

21. 如申請專利範圍第17項之方法，其中，該組織包含經BSE感染組織。

22. 如申請專利範圍第17項之方法，其中，該組織包含羊組織。

23. 如申請專利範圍第17項之方法，其中，該組織包含經搔癢症感染組織。

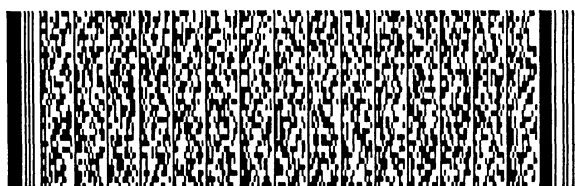
24. 如申請專利範圍第17項之方法，其中，該組織係選自腦、攝護腺、腸、肺、心、腎及脾組織組成的組群。

25. 如申請專利範圍第17項之方法，其中，該組織係得自傳染性普里昂蛋白質之帶原動物。

26. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，該處包含懷疑受傳染性普里昂蛋白質污染物品。

27. 如申請專利範圍第26項之方法，其中，該物品包含手術器材。

28. 如申請專利範圍第27項之方法，其中，該手術器材係選自下列組成的組群：鉗子、鑷子、剪刀、刀子、纜線、衝孔機、小鉗子、套管、卡鉗、雕刻刀、刮匙、剝除



六、申請專利範圍

器、擴張器、夾子施用器、牽引器、收縮器、挖掘器、針夾持器、抽吸管、凝固電極、腦電波圖深度電極、肋骨及胸骨開闊器、兩極性探針及肋骨夾。

29. 如申請專利範圍第26項之方法，其中，該物品包含餐具及廚具。

30. 如申請專利範圍第29項之方法，其中，該餐具及廚具係選自下列組成的組群：刀、叉、剪、削皮刀、削皮器、切片器、刮除機、以及切肉刀。

31. 如申請專利範圍第26項之方法，其中，該物品包含實驗室裝置。

32. 如申請專利範圍第31項之方法，其中，該實驗室裝置係選自下列組成的組群：容器、過濾裝置、離心機、分光光度計及螢光計。

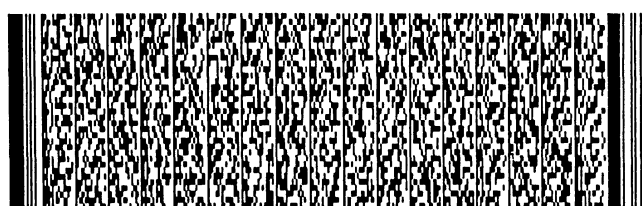
33. 如申請專利範圍第26項之方法，其中，該物品包含獸醫器械。

34. 如申請專利範圍第33項之方法，其中，該獸醫器械係選自鉗子、鑷子、刀子、鋸子、探針、及電擊設備組成的組群。

35. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，該蛋白質水解酶包含蛋白酶。

36. 如申請專利範圍第35項之方法，其中，該蛋白酶包含羧基水解酶。

37. 如申請專利範圍第36項之方法，其中，該羧基水解酶包含枯草桿菌蛋白酶(subtilisin)。



六、申請專利範圍

38. 如申請專利範圍第37項之方法，其中，該枯草桿菌蛋白酶包含野生型澱粉液化桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)枯草桿菌蛋白酶突變株，包含一或多個胺基酸取代、添加或刪去。

39. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，步驟(a)之溫度係低於普里昂蛋白質之熱解消滅溫度。

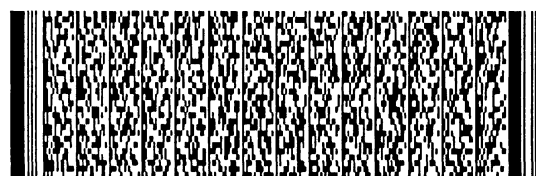
40. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，該處包含含有或受傳染性普里昂蛋白質污染之牛組織，以及其中該方法包含下列步驟：(a)於約100℃至約150℃範圍之溫度烹煮牛組織，接著(b)將牛組織於約35℃至約100℃範圍之溫度暴露於蛋白質水解酶，其中，該蛋白質水解酶呈熱穩定性以及可有效進行蛋白質分解，俾至少部份消滅牛組織所帶有的傳染性普里昂蛋白質。

41. 如申請專利範圍第40項之方法，其中，該烹煮係進行約5分鐘至約5小時時間。

42. 如申請專利範圍第40項之方法，其中，該蛋白質水解酶包含苔蘚生成桿菌PWD-1角蛋白酶。

43. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，步驟(a)及(b)係同時進行，經由將該處所暴露於熱穩定性蛋白分解酶在足夠溫度及經歷足夠時間下，俾至少部份分解傳染性普里昂蛋白質。

44. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，該處包含受媒介BSE感染之傳染性普里昂蛋白質之動物肉品或副產品，以及其中該方法包含於足夠溫度使用耐熱蛋白酶處理該動



六、申請專利範圍

物肉品或副產品以及經歷足夠時間俾消滅其中所含之媒介BSE之傳染性普里昂蛋白質之步驟。

45. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，該處包含受傳染性普里昂蛋白質污染之手術器材，其中步驟(a)係於約100℃至約150℃範圍之溫度進行，以及其中步驟(b)係於約35℃至約100℃範圍之溫度進行，其中，該蛋白質水解酶呈熱穩定性且可有效進行蛋白質分解，俾至少部份消滅污染手術器材之傳染性普里昂蛋白質。

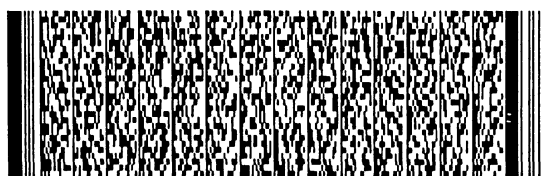
46. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，步驟(b)係使用清潔組成物進行，該清潔組成物包含一約0.2克/升至約1.0克/升範圍之濃度溶解角蛋白酶於溶劑。

47. 如申請專利範圍第46項之方法，其中，該用於溶解角蛋白酶之溶劑係選自蒸餾水、醇、緩衝溶液、及清潔劑溶液組成的組群。

48. 如申請專利範圍第46項之方法，其中，該清潔組成物進一步包含一或多種選自界面活性劑、助洗劑、加強劑及填充劑組成的組群之化學添加劑。

49. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，該處包含含有或受傳染性普里昂蛋白質污染之組織，以及其中步驟(a)及(b)係同時進行，經由於高於40℃但低於普里昂蛋白質之熱解消滅溫度之溫度下，加熱組織且同時暴露組織於熱穩定性蛋白質水解酶並經歷足夠時間，俾至少部份分解傳染性普里昂蛋白質。

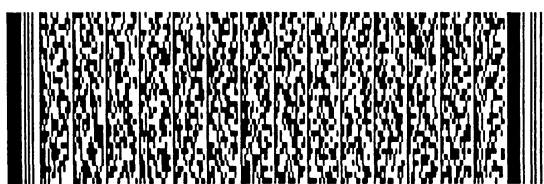
50. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，該處包含受媒



六、申請專利範圍

介BSE之傳染性普里昂蛋白質污染之動物肉品或副產品，以及其中該方法包含下述步驟，使用耐熱蛋白酶於高於60℃但低於普里昂蛋白質之熱解消滅溫度之溫度處理動物肉品或副產品並經歷足夠時間，俾消滅其中所含媒介BSE之傳染性普里昂蛋白質。

51. 如申請專利範圍第1項之方法，其中，該處包含動物肉品或副產品，以及其中步驟(b)之進行係經由使用消滅與該動物肉品或副產品相關之任何傳染性普里昂蛋白質用之蛋白酶，於高於40℃但低於普里昂蛋白質之熱解消滅溫度之溫度並經歷一段足夠時間進行。



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

