



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1494438 B

(45) 授权公告日 2010.05.05

(21) 申请号 02805928.X

A61L 101/54 (2006.01)

(22) 申请日 2002.01.31

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

PR2938 2001.02.07 AU

CN 1279954 A, 2001.01.17, 权利要求1和说明书第2页19-21行.

WO 9002562 A1, 1990.03.22, 全文.

WO 9951279 A1, 1999.10.14, 全文.

WO 9942829 A1, 1999.08.26, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2003.09.03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/AU2002/000092 2002.01.31

审查员 杨颖

(87) PCT申请的公布数据

W002/062400 EN 2002.08.15

(73) 专利权人 诺瓦制药研究(澳大利亚)股份有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

(72) 发明人 S·克里茨勒 A·萨瓦

M·扎鲁纳多

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李华英

(51) Int. Cl.

A61L 2/26 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 10 页

(54) 发明名称

朊病毒的消毒

(57) 摘要

本发明涉及一种用于处理被 PrP^{Sc} 朊病毒蛋白或其替代物污染的表面、悬浮液或溶液的方法和组合物。该方法和组合物使用一种或多种有效地将朊病毒蛋白切割成具有非感染性分子量的片段的酶和一种或多种经选择以有利于 PrP^{Sc} 朊病毒蛋白构象解折叠而不使所述一种或多种酶变性的因子的组合。

1. 一种消毒方法,所述方法包括同时采用以下组合处理被 PrP^{Sc} 朊病毒蛋白污染的表面、悬浮物或溶液的步骤:(1) 一种或多种经选择将朊病毒蛋白切割成具有非感染性分子量的片段的酶,(2) 选自热、pH、倾向于使蛋白变性的有机溶剂、离液剂、倾向于结合蛋白的表面活性剂、作为强蛋白变性剂的无机盐、导致 S-S 键断裂的因子、对氨基酸的亲水残基具有强亲和力的物质、对氨基酸的疏水残基具有强亲和力的物质、促进表面吸附的物质、阴离子型表面活性剂以及前述的组合以有利于 PrP^{Sc} 朊病毒蛋白构象解折叠而不使所述一种或多种酶变性的因子,和 (3) 选自亲核溶剂、弱质子稳定溶剂、非离子型表面活性剂、离子型表面活性剂、缓冲液、具有表面活性的均 -、共 - 或嵌段共聚物、硫酸化化合物、脱氧胆酸盐、糖胺聚糖以及前述物质的组合以促进或保护所述一种或多种酶折叠同时不阻止朊病毒蛋白被切割的因子。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中选择所述处理以导致在切割后产生预定百分比的具有小于预定分子量的分子量的蛋白质片段。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法,其中经过切割后至少 90% 的蛋白片段具有低于 27kDa 的分子量。

4. 根据权利要求 1 或 2 的方法,其中经过切割后至少 90% 的蛋白片段具有低于 25kDa 的分子量。

5. 根据权利要求 1 或 2 的方法,其中经过切割后至少 90% 的蛋白片段具有低于 23kDa 的分子量。

6. 根据权利要求 5 的方法,其中对条件进行选择以有利于解折叠优于重折叠。

7. 根据权利要求 1 的方法,其中所述经选择以有利于构象解折叠的因子进一步选自以下的一种或多种:辐射、电场、磁场、能量振动及其组合。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中能量振动是超声、电磁或机械振动中的一种或多种。

9. 根据权利要求 1 的方法,其中所述的一种或多种酶选自丝氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、角蛋白酶、胶原酶和具有蛋白水解活性的酶。

10. 根据权利要求 1 的方法,其中经选择以促进解折叠的因子选自十二烷基苯磺酸、SDS 或 DMSO。

11. 根据权利要求 1 的方法,其中的因子 (3) 选自 Teric 164、两性离子表面活性剂、硼砂或 Triton X-100。

12. 根据权利要求 1 的方法,其中所述的离子型表面活性剂为两性表面活性剂。

13. 根据权利要求 12 的方法,其中所述两性表面活性剂是 Empigen BS/AU。

14. 根据权利要求 1 的方法,其中所述选择的用于促进解折叠的因子是阴离子型表面活性剂。

15. 一种用于处理被 PrP^{Sc} 朊病毒蛋白污染的表面组合物的方法,所述组合物包含:(1) 一种或多种经选择将朊病毒蛋白切割成具有非感染性分子量的片段的酶,(2) 选自十二烷基苯磺酸、SDS 或 DMSO 以有利于促进 PrP^{Sc} 朊病毒蛋白构象解折叠而不使所述一种或多种酶变性的因子,和 (3) 选自 Teric 164、两性离子表面活性剂、硼砂或 TritonX-100 以促进或保护所述一种或多种酶折叠同时不阻止朊病毒蛋白被切割的因子。

16. 根据权利要求 15 的组合物,其中选择所述的因子 (2) 和因子 (3) 以导致在切割后

产生预定百分比的具有小于预定分子量的分子量的蛋白质片段。

17. 根据权利要求 15 的组合物,其中选择所述的因子(2)和因子(3)以导致在切割后至少 90%切割后的蛋白片段具有低于 27kDa 的分子量。

18. 根据权利要求 15 的组合物,其中选择所述的因子(2)和因子(3)以导致在切割后至少 90%的蛋白片段具有低于 25kDa 的分子量。

19. 根据权利要求 15 的组合物,其中选择所述的因子(2)和因子(3)以导致在切割后至少 90%的蛋白片段具有低于 23kDa 的分子量。

20. 一种处理被 PrP^{Sc} 朊病毒蛋白污染的表面的方法,其中用权利要求 15-19 之任一组的组合物对该表面进行处理。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,其中该表面是医疗或外科器械的表面。

22. 根据权利要求 20 所述的方法,其中该表面是食物制品或医院工作表面。

朊病毒的消毒

技术领域

[0001] 本发明涉及灭活朊病毒的组合物和方法,以及对被朊病毒或类似的构象改变的蛋白质污染的材料进行消毒的方法。

背景技术

[0002] 在历史上,感染病原如细菌、真菌、寄生虫和类病毒都有很好确立的控制方法,包括各种形式的消毒和灭菌(例如蒸汽灭菌法,干灭菌法,巴氏消毒法,过滤除菌法,利用环氧乙烷、戊二醛、苯酚或其它化学消毒试剂进行处理以及辐射等)。对于病毒,也有一些既定的方法,例如将 pH 值降低到 4.0 或更低、60°C 下延长加热时间或使用高浓度的有机溶剂。此外,还使用过紫外线处理、甲醛和特效抗病毒剂。

[0003] 近年来,出现了以前未知的新的致病原物种,并在科学出版物上已有相关报道。人们将其称之为朊病毒,其代表了当今卫生保健业面临的巨大挑战之一。朊病毒是一种感染性粒子,它不同于细菌和其它先前已知的感染病原。虽然没有可靠的证据确定朊病毒的确切结构,但是近来在人类和动物中已经确诊的许多疾病看起来都是由朊病毒引起的。如 PCT/US00/14353(该文献的内容在此引作参考)中的详述,朊病毒导致的人类疾病包括库鲁病、克罗伊茨费尔特-雅各布病(CJD)、格施沙病(GSS)和致死性家族失眠症(FFI)。

[0004] 除了人类的朊病毒疾病外,已知的朊病毒疾病组中还包括动物的疾患。绵羊和山羊的痒病也许是研究最多的动物朊病毒疾病。一系列调查都已提示变种 CJD 与以前的流行病牛海绵状脑病(BSE)有关。但至今还没有发展出成功的治疗方法,因此这些疾病仍然是致命的。除上述问题以外,还有一个事实就是朊病毒在人体的潜伏期可长达 30 年,该因素向相关科学家提出一个巨大挑战,其中某些科学家预测一种流行病正“在途中”。

[0005] 可能处于感染危险的人群包括在手术中可能接触到受染医疗器械的病人、解剖受染物质的医护人员以及负责清洗和消毒器械的保健工作人员。令人关注的还有,有此危险的人群可能扩展到包括接触牛或牛肉的兽医、屠宰场的工作人员和肉商(主要在欧洲),以及新近接受来自潜伏有朊病毒疾病的供体的输血或器官移植的人。

[0006] 朊病毒的结构已成为集中研究的主题,科学家们对该病毒的结构持有不同的观点。有些科学家认为它们是极小的病毒,然而大多数专家现在都认为朊病毒实际上是没有 DNA 或 RNA 核心的感染性蛋白质。更具体地,目前一致认为哺乳动物的 PrP 基因表达一种蛋白质,该蛋白质可以是可溶的、非疾病的细胞形式 PrP^c,或可以是不溶的疾病形式 PrP^{Sc}。许多方面的证据表明,朊病毒疾病是由于正常的细胞形式转变成异常的 PrP^{Sc} 形式而导致的。在这两种形式的氨基酸序列中不存在可检测的差别。PrP^c 形式由可被蛋白酶 K 消化而降解的 33-35kDa 高度膜相关蛋白组成。然而 PrP^{Sc} 形式具有一种改变的构象形式,具体地说具有高水平的 β -折叠构象。用于诊断具有感染性的改变的构象形式的 PrP^{Sc} 的特性就是其 27-30kDa 的耐蛋白酶核心。改变构象的感染性形式的另一显著特征就是它获得了一个疏水性核心。

[0007] 常规的消毒剂和灭菌剂在可接受的时间里对朊病毒都没有显著的影响。曾多次尝

试灭活朊病毒和 / 或消毒可能染有该病毒的表面, 但该病毒却表现出非凡的抵抗性。无论是在时间和费用上, 还是在对材料的损坏和所涉及的职业健康危害方面, 杀灭朊病毒所需的条件通常都过于严格而无法在常规的消毒中实施。例如在一项研究中, 试样在 600℃ 的温度下经 5-15 分钟干热后仍然检测到了感染性 PrP^{Sc} 粒子, 尽管在 1000℃ 的温度下 15 分钟内和高于 200℃ 的温度下 1-10 小时内可以实现完全破坏。有人建议采用 1M 苛性钠 (pH 值为 14) 处理 2 小时, 但是这种处理腐蚀性极强、对工作人员有危险并侵蚀材料。US5633349 公开了一种处理生物材料的方法, 包括采用 6-8 摩尔尿素或 1-2 摩尔硫氰酸钠处理最少 12 小时 (优选 18 小时), 但该方法同样具有类似的缺点。

[0008] 由于净化去污比较困难, 所以有人提议优选用于脑外科手术的外科器械应该是一次性使用的, 但这意味着除了费用昂贵以及对于有些器械来说不现实之外, 处理这些器械也有一定危险。PCT/US00/14353 描述了一种通过使用聚阳离子树状聚合物使朊病毒不具感染性的方法, 但是该过程是可逆的还是永久性的以及对于表面消毒是否具有商业可行性都还不太清楚。

[0009] 尽管注意力已经集中在 PrP^C 形式和 PrP^{Sc} 形式上, 但还有人提出该蛋白质可能以一种中间形式存在, 该中间形式的 β -折叠含量介于 PrP^C 形式 α 螺旋为主的结构和 PrP^{Sc} 形式 β -折叠为主的构象之间, 并能在缺乏变性剂的条件下保持其溶解性。

[0010] 认为正常情况下可溶的蛋白装配或误装配成构象改变的不溶蛋白可导致许多其它疾病或牵连其中。虽然本发明在此将涉及朊病毒进行描述, 应理解其对于与疾病有关的其它不溶或耐酶的构象改变蛋白同样适用。

[0011] 对于现有技术的上述讨论不应理解为承认澳大利亚的公知常识。

[0012] 本发明的一个目的是提供对被朊病毒感染的表面进行消毒的改良的或至少是可供选择的方法。在某些优选的实施方案中, 本发明更有效地使朊病毒失活, 也就是说与现有技术的方法相比, 本发明在给定时间内更有效, 或者在更短的时间内同样有效。本发明某些高度优选的实施方案在低于 60℃ 的温度下、少于 60 分钟的时间内实现优于 4 个对数级的降低。在一些实施方案中, 本发明也适用于除表面以外其它情形下的朊病毒, 例如在固体、液体、气体介质中的悬浮物或在生物体系中, 本发明还可能有其它体外或体内用途。本发明中一些实施方案的目的是提供改进的诊断工具, 另外一些实施方案则是为抗体的制备提供新的差向异构体。

[0013] 本文中所用的术语“朊病毒蛋白”包括变体、片段、融合体以及类似物, 其具有与全长朊病毒蛋白序列基本上相同的其它相互作用或活性, 但可能更便于使用, 并包括所有形式的二级结构。本文使用的该术语还包括朊病毒替代物, 即本身不是朊病毒但具有与朊病毒类似的结构或表现出类似行为的蛋白质, 这些蛋白质可用作其模型或用于预测朊病毒在特定的条件下将如何表现。术语“PrP^{Sc} 朊病毒蛋白”旨在具有类似广泛的含义, 但仅局限于由于其二级或三级结构而耐酶的朊病毒蛋白, 且它包括类似地耐酶的构象。

[0014] 本发明的描述

[0015] 第一方面, 本发明提供一种消毒方法, 包括同时用 (1) 和 (2) 的组合对被 PrP^{Sc} 朊病毒蛋白污染的表面进行处理的步骤, 其中 (1) 为一种或多种可有效将朊病毒蛋白切割成具有非感染性分子量的片段的酶; (2) 为一种或多种经选择以利于 PrP^{Sc} 朊病毒蛋白构象解折叠同时不使上述一种或多种酶变性的因子。

[0016] 第二方面,本发明根据第一方面提供一种方法,进一步包括(3)一种或多种经选择以促进或保护上述一种或多种酶的折叠而不阻止该朊病毒蛋白被切割的因子。优选地,对条件进行选择以有利于解折叠优于重折叠。

[0017] 目前公认分子量低于 27kDa 的蛋白是非感染性和安全的,因此本发明的方法设想将该朊病毒消化或切割成片段,其中至少 90%,优选至少 98%片段的分子量低于 27kDa,优选低于 25kDa,更优选低于 23kDa。但是如果将来发现低于 27kDa 的蛋白质具有感染性,那么本发明的方法可用于将该蛋白质切割成任何安全大小的片段。

[0018] 本文中所述的术语“因子(agent)”根据上下文的需要既包括化学试剂如阴离子表面活性剂、调节 pH 值的试剂,也包括实现物理和/或热力学条件如压力、温度、辐射的非化学因子,以及促进折叠或解折叠的其它能量影响因素。折叠因子有时被称为“重折叠”因子。解折叠因子有时被称为“变性”因子。

[0019] 第三方面,本发明根据第一或第二方面提供一种方法,其中所述的一种或多种经选择以利于构象解折叠的因子包括一种或多种选自以下的因子:辐射、电场、磁场、能量振动及其组合。

[0020] 在本发明高度优选的实施方案中,采用了化学与物理因子的组合,例如步骤(2)的因子包括阴离子表面活性剂与超声处理相结合。

[0021] 优选地,在处理过程中使朊病毒受到超声范围内的声波作用。然而其它形式的辐射如微波辐射、射频辐射、红外、可见光或紫外光谱、可听或更低频率的声音、利用机械手段如磁力或涡旋搅拌而产生的能量振动也可诱导或有助于解折叠。其它形式的能量输入可包括来自电子束辐射、激光辐射或电解。

[0022] 本发明其它方面延伸至包括用于实施该方法的组合物、由该方法产生的新的朊病毒片段以及由所述片段制备出的新抗体。

[0023] 根据本发明,采用(1)和(2)的组合对受污染的表面,例如被 PrP^{Sc} 蛋白污染的外科器械进行处理,其中(1)为一种或多种可有效将该朊病毒蛋白切割成非感染性分子量(当前是低于 27kDa)的片段的酶;(2)为一种或多种经选择以利于该朊病毒蛋白构象解折叠的因子。

[0024] PrP^{Sc} 蛋白特征性地耐受酶包括蛋白水解酶的攻击。在不希望拘泥于理论的情况下,本发明者认为 PrP^{Sc} 蛋白对酶攻击的抵抗性是因为其折叠的构象(相对于 α 螺旋结构具有高比例的 β -折叠二级结构)所致。本发明包括这样一种观念,即可选择一种或多种因子以在所选择的条件下促进 PrP^{Sc} 蛋白充分解折叠而足以使酶获得进入并切割 PrP^{Sc} 蛋白。

[0025] 许多蛋白都倾向于使它们天然的三维折叠模式(“二次和三级结构”)变得松散和成为“变性的”。变性包括分子内相互作用尤其是氢键与二硫键的破坏,从而导致二级结构的丧失,事实上所有天然蛋白至少在部分分子中都具有此种二级结构,而该二级结构通常对该蛋白的活性起决定作用。

[0026] 本领域技术人员了解酶本身就是蛋白质,促进蛋白解折叠的因子很容易使其变性。还不太清楚是因为解折叠因子结合酶,从而阻止酶结合目标底物,还是更有可能是因为解折叠因子促进酶构象结构的解折叠,从而使其失活或“变性”,或者是上述影响的共同作用。另一方面,PrP^{Sc} 蛋白对解折叠高度抵抗。迄今为止认为配制一个体系,使其中的酶在可有效影响如 PrP^{Sc} 这样的难处理蛋白质的解折叠因子存在下还能保持活性是不可能的。令

人吃惊地是,本发明者已经发现:(i) 某种特定的解折叠因子选择性地解折叠或松弛 PrP^{Sc} 蛋白而不解折叠(变性)所选择的酶,或者(ii) 折叠因子和解折叠因子可以以这样一种方式组合,使得折叠因子选择性地促进或保持酶的活性,而解折叠因子选择性并充分地将朊病毒解折叠以使酶进入对朊病毒进行断裂。

[0027] 通过将因子分为促进“折叠”或“解折叠”,然后确定它们对于酶和 PrP^{Sc} 蛋白或其替代物的相对作用,使得这些本质上矛盾的需要在本发明中得以满足。

[0028] 可先用一种或多种因子处理该表面,随后可加入一种或多种酶,但是在优选的实施方案中,同时用这两者处理该表面。

[0029] 所述酶优选为一种蛋白水解酶。合适的酶是:

[0030] - 非特异性的蛋白酶,例如丝氨酸-、天冬氨酸-、金属蛋白酶

[0031] - 更特异性的蛋白酶,例如角蛋白酶、胶原酶等

[0032] - 具有蛋白水解活性的任何其它酶

[0033] 选择上述一种或多种经选择以利于朊病毒蛋白构象解折叠的因子以有效地为该酶提供进入朊病毒蛋白的通道。

[0034] 一般而言,多肽链的折叠-解折叠可能是一种热力学可逆的平衡过程,或者可能是不可逆的。

[0035] 仅作为举例,促进解折叠(变性)的因子包括:-

[0036] (1) 热-温度升高至约 150°C。

[0037] (2) pH-pH 值低于 3 和高于 9(易受溶剂影响的许多侧链残基电离产生的总体效应)或者在一些分子中可能归因于由特异性基团电离产生的局部效应(例如丝氨酸蛋白酶使羧酸盐的 N-端氨基发生电离)

[0038] (3) 一类倾向于使蛋白质变性、溶解或膨胀的经选择的有机溶剂。通常其产物不完全解折叠并具有一种不同于天然状态的有序构象。有利于螺旋构象(也就是解折叠)的溶剂实例为 N-二甲基甲酰胺、甲酰胺、间甲酚、二噁烷、CHCl₃、吡啶、二氯乙烯和 2-氯乙醇。这类物质还包括具有微弱趋势形成氢键的溶剂如醇类、乙醇、正丙醇、甲醇(尤其是其与 0.01% HCl 的混合物),还包括倾向于破坏蛋白质结构的溶剂,例如高浓度的二甲基亚砷(DMSO)、二氯乙酸和三氟醋酸以及其它亲电子溶剂。

[0039] (4) 某些有机溶质和离液剂,如尿素、盐酸胍(GuHCl)。室温下 6-8M 的 GuHCl 就可完成到无规卷曲多肽的转变,除外某些异常稳定的蛋白质。这些试剂显著地受到温度、pH 值、其它试剂和条件的影响。

[0040] (5) 某些表面活性剂-离子型表面活性剂倾向于结合蛋白并引发三级结构的解折叠。阴离子去污剂是非常强的变性剂。例如十二烷基硫酸钠(SDS)在接近临界胶束浓度的浓度下能完全解折叠许多(但不是全部)蛋白质。十二烷基苯磺酸盐也是一种变性剂。所述去污剂不一定会导致完全的解折叠,因为在一些情况下,该去污剂的疏水部分可能与蛋白的有序结构相互作用形成胶束区域。阳离子型表面活性剂通常是不如阴离子型有效的解折叠剂。十二烷基乙氧基硫酸盐使牛血清白蛋白(BSA)变性的趋势随着乙氧基团的增加而下降,当乙氧基的数目大于 6 时消失。

[0041] (6) 无机盐可引起蛋白的构象转换。例如 LiBr、CaCl₂、KSCN、NaI、NaBr 和叠氮化钠都是强的变性剂。虽然这些盐不一定导致蛋白完全解折叠,但是残余的有序结构可能会被

能量输入如升高温度而破坏。阴离子如 $\text{CNS}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{SO}_4^-$ 表现出与胍盐和四烷基季铵盐相似的行为。然而已经观察到 $(\text{GuH})_2\text{SO}_4$ 可以保护某些蛋白不发生变性。

[0042] (7) 导致 S-S 键断裂的因子如巯基二醇类

[0043] (8) 对氨基酸的亲水或疏水残基具有强亲和性的其它物质

[0044] (9) 在某种表面和界面包括沸石包括气 / 液界面的吸附作用

[0045] (10) 超声能量、红外和微波辐射、高压以及使质子经受电场和 / 或磁场作用也许能够促进解折叠 (重折叠), 甚至震荡或搅拌对其或许也是有影响的。

[0046] 在本发明优选的形式中使用了因子的组合, 如采用表面活性剂和 / 或合适的溶剂, 并使用超声。还不太清楚能量输入如来自超声的能量是否有助于推动折叠 / 解折叠的平衡, 以有利于 PrP^{Sc} 蛋白以比其使酶变性更快的速率解折叠, 或者是否其仅仅有助于为试剂或酶提供接近进入朊病毒的通道, 还是它可有效活化该酶。应用能量的其它方法包括应用亚音速范围内的声波。然而能量振动可由其它形式的电机辐射引起或能量振动可来自机械手段如磁力或涡旋搅拌。其它形式的能量输入还可包括来自电子束辐射、激光或电解。

[0047] 如上所述, 大部分讨论的解折叠因子预期都将会有效地使酶变性。解折叠因子及其使用条件都必须经过精心的选择以允许 PrP^{Sc} 蛋白或其替代物被消化而不使酶变性, 或者必须将解折叠因子与折叠试剂相组合。

[0048] 合适的折叠因子包括

[0049] (1) 亲核溶剂以及高度氢键键合的有机溶剂。在肽氢键的能量与溶剂分子间氢键的强度之间存在一种竞争。当溶剂分子被强的氢键连接时, 平衡就朝着肽氢键稳定化的方向移动。溶剂如二噁烷、乙腈、二甲基甲酰胺、吡啶以及低浓度的二甲基亚砷 (DMSO) 是好的质子受体但是弱的质子供体, 其具有非常弱的破坏肽氢键的趋势, 并且倾向于产生有序的构象, 尤其对于球状蛋白质而言, 这些溶剂更是如此。

[0050] (2) 稳定溶剂如多元醇 (例如甘油、乙二醇和丙二醇、蔗糖及诸如此类) 是弱质子溶剂, 在其存在下蛋白倾向于保持构象稳定, 因此可将其用作稳定剂。

[0051] (3) 非离子型表面活性剂如烷基、苯基、烷基乙氧基化物、丙氧基化物或其共聚物、烷基多葡萄糖苷等、肌氨酸盐 (例如 (N-月桂酰) 肌氨酸钠) 都不会改变蛋白的三级结构, 任何解折叠均发生在等温线区域, 其中由非特异性协同相互作用导致的表面活性剂结合开始显著增加。加入非离子或两性表面活性剂可降低 SDS 的效果。

[0052] (4) 两性离子表面活性剂和两性表面活性剂,

[0053] (5) 高浓度的缓冲液, (例如磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、硼酸盐)

[0054] (6) 含有交替排列的弱疏水区和弱亲水区的表面活性剂、共嵌段聚合物,

[0055] (7) 保护剂如硫酸化化合物、脱氧胆酸盐和糖胺聚糖。如果一种折叠因子与一种解折叠 (变性) 剂组合, 那么所述因子及条件必须经过选择, 以保护或重折叠该酶而同时不可逆地解折叠或至少充分打开该朊病毒从而使该酶可以进入。例如可以选择一定的 pH 值和 / 或温度以使该折叠因子选择性地作用于酶, 而该解折叠因子选择性地作用于 PrP^{Sc} 蛋白。

[0056] 实施本发明的最佳方式

[0057] 使用高球蛋白含量的牛白蛋白 (Sigma 产品 A7906)、 β -半乳糖苷酶 (G7279) 和兔肌球蛋白 (M0163) 作为具有低溶解度和高 β -折叠含量的蛋白质的模型。上述蛋白的分

子量显著大于朊病毒。经酶消化后肽片段分子量的确定更容易,因为本实验中所用的大部分蛋白酶都具有与朊病毒相似的分子量(20-35KDa)。

[0058] 利用 Laemmli U.K., Nature, 227, pages 680-685, (1970) 中所述的方法实施 SDS-PAGE。先将蛋白溶液在含 2% SDS 的样本缓冲液中煮沸 2 分钟。在 1.5mm 聚丙烯酰胺板凝胶(8-12%) 每个电泳泳道中加入 10 μ l 蛋白,并经受非还原性条件(也就是在样本缓冲液中无 β -巯基乙醇)。在 150V 的条件下电泳 1 小时,直至染料前沿到达该凝胶的底部。然后取出该凝胶,用考马斯亮蓝 R-250(Sigma) 或银染(Bio-Rad) 染色使蛋白条带显色。通过使用预染低分子量标准参照物(Bio-Rad) 所获得的校准曲线确定蛋白的分子量值。

[0059] 如果在解折叠因子和酶的联合作用后检测不到分子量大于 39.8KDa 的片段,就可认为对该蛋白的切割是充分的。这表明该种处理对其替代物是有效的。

[0060] 当存在分子量大于 39.8KDa 的肽片段时,报告结果为阳性。

[0061] 为了证明本发明的方法不仅可以切割替代物,而且还可用于使朊病毒失活,采用了由 Prionics AG 研究出来的朊病毒检测试验。“Prionics-Check”是一种使用由 PRIONICS AG 研制出来的新抗体对动物组织中的朊病毒进行检测的免疫测试。存在于反应混合物中的 PrP^{Sc} 被所述抗体结合,然后再利用偶联到该抗体上的酶进行检测。

[0062] 向 100ml 等分的如表 1 所述的溶液中掺加约 1 μ g 的重组朊病毒蛋白,然后按照附录 1 所述的步骤进行 Prionics Check。

[0063] 当经过酶消化后检测到 PrP^{Sc} 时,结果报告为阳性。表 1 显示在对照实验 1-1 到 6-1 中,检测到分子量大于 39.8KDa 的片段,正如检测到 PrP^{Sc}。然而在实验 1-2 到 6-2 中,没有检测到分子量大于 39.8KDa 的片段并且未检测到 PrP^{Sc}。1-1 与 1-2 的不同之处是包括了在 70°C 30 分钟内显示出有效的解折叠因子(3% DOBS)。

[0064] 2-2 和 3-2 分别与 2-1 和 3-1 的不同之处在于包含超声处理。在 2-2 中,与 25% Terric 164(一种折叠因子) 组合的解折叠因子 3% DOBS 在 25°C 伴有 40kHz 超声处理的条件下是有效的。在 3-2 中,以 10% SDS 作为解折叠因子,以两性离子表面活性剂作为折叠因子,在 2.6mHz 的条件下得到相似的结果。4-2 与 4-1 不同之处为在更高温度下硼砂与 SDS 的组合。5-2 与 5-1 不同之处在于无硼存在时将 DOBS 与 TritonX-100 组合。6-2 与 6-1 不同之处就在于其中将 DMSO 的浓度从可逆解折叠(0.05%) 增大到不可逆解折叠(0.5%)。

[0065] 不偏离本文中所教导的发明构思,可使用各种因子的其它组合来实施本发明,这对于本领域技术人员依据其教导是显而易见的。

[0066] 表 1

[0067]

No.	测试步骤 / 溶液	SDS-PAGE 白蛋白	SDS-PAGE β - 半乳糖 苷酶	SDS-PAGE 肌球蛋白	Prionics Check
1-1	蒸馏水 加热至 70°C 保持在 70°C 水浴 30 分钟, 15 单位蛋白酶活性 /ml, pH9 冷却至 25°C	+	+	+	+
1-2	3% DOBS 和蒸馏水 1 : 100 稀释 加热至 70°C 保持在 70°C 水浴 30 分钟, 15 单位蛋白酶活性 /ml, pH9 冷却至 25°C	-	-	-	-
2-1	3% DOBS、25% Teric164 1 : 100 稀释 15 单位蛋白酶活性 /ml, pH9 25°C 30 分钟	+	+	+	+
2-2	3% DOBS、25% Teric164 1 : 100 稀释 15 单位蛋白酶活性 /ml 40kHz 超声处理 25°C 30 分钟	-	-	-	-
3-1	10% SDS 10% EmpigenBS/AU (两	+	+	+	+

No.	测试步骤 / 溶液	SDS-PAGE 白蛋白	SDS-PAGE β -半乳糖 苷酶	SDS-PAGE 肌球蛋白	Prionics Check
	性离子表面活性剂) 1 : 100 稀释 15 单位蛋白酶活性 /ml, pH9 25°C 30min				
3-2	10% SDS 10% EmpigenBS/AU (两 性离子表面活性剂) 1 : 100 稀释 15 单位蛋白酶活性 /ml, pH9 25°C 2.6mHz 超声处理 30min	-	-	-	-
4-1	10% SDS, 4% 硼砂 1 : 100 稀释 15 单位蛋白酶活性 /ml, pH9 25°C 30min	+	+	+	+
4-2	10% SDS, 4% 硼砂 1 : 100 稀释 15 单位蛋白酶活性 /ml, pH9 55°C 30min	-	-	-	-
5-1	15% DOBS 5% TritonX100, 4% 硼砂 1 : 100 稀释 15 单位蛋白酶活性 /ml, pH9 25°C 30min	+	+	+	+

No.	测试步骤 / 溶液	SDS-PAGE 白蛋白	SDS-PAGE β - 半乳糖 苷酶	SDS-PAGE 肌球蛋白	Prionics Check
5-2	15% DOBS 5% TritonX100 1 : 100 稀释 15 单位蛋白酶活性 /ml, pH9 25°C 30min	-	-	-	-
6-1	0.05% DMSO 15 单位蛋白酶活性 /ml, pH9 25°C 30min	+	+	+	+
6-2	0.5% DMSO 15 单位蛋白酶活性 /ml, pH9 25°C 30min	-	-	-	-

[0068] DOBS = 十二烷基苯磺酸 (Sigma 产品 No. D2525)

[0069] DMSO = 二甲基亚砷 (Sigma 产品 No. D5879)

[0070] 蛋白酶 = 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg (Sigma 产品 No. P5380)

[0071] 使用由 UNISONICS Pty Ltd. 提供的超声浴进行 40kHz 超声处理

[0072] 使用 Disonics Pty Ltd. 喷雾器进行 2.6MHz 超声处理。

[0073] 附录 1

[0074] Prionics Check 测试方法

[0075] 下面的方案描述了使用来自已知代表天然存在的感染病原的重组来源的 PrP^{Sc} 的耐蛋白酶核心。已经实验证明耐蛋白酶的朊病毒核心是不具有感染性的,但其表明感染病原的存在。

[0076] 1. 称取 1 μ g 已被 PrP^{Sc} 或 BSE 感染并包含 1mcg PrP^{Sc} 的动物脑组织匀浆,将其置于 1ml 去离子水中重组

[0077] 2. 将其加入到 10ml 的测试溶液中,经过适当的失活步骤

[0078] 3. 取 10 μ l 等份的该测试溶液加入到 10 μ l 样本缓冲液中

[0079] 4. 对下面的物质进行 SDS-PAGE

[0080] - 用于掺加的未处理的 PrP^{Sc} 溶液 (阳性对照)

[0081] - 研究溶液

[0082] 所有的蛋白或蛋白片段在电场中根据它们的大小进行分离。小的蛋白比大的蛋白

迁移地快。经过一段时间后,分解的朊病毒蛋白的最小片段迁移出凝胶,而抗性 PrP^{Sc} 片段将存在于凝胶的下半部分。在对照试样中,朊病毒蛋白保持对蛋白酶的抵抗力,未切割的 PrP^{Sc} 分子将留在凝胶中较高的位置。

[0083] 1. 通过蛋白质印迹法将蛋白从凝胶转移到硝酸纤维素膜。

[0084] 2. 添加单克隆抗体 (Prionics 产品 No. 01-020)。

[0085] 3. 使其与蛋白结合,然后洗掉未结合的抗体。

[0086] 4. 使缀合到初级抗体上的辣根过氧化物酶与化学发光底物 (由 AMERSHAM Life Science 提供的 ECL 产品 No. RPN2209) 发生反应

[0087] 5. 将该膜曝光于 X 光底片,使底片显影。

[0088] 6. 10. 评价朊病毒蛋白是否存在。当抗体停留在相当于朊病毒蛋白分子量的位置时,报告结果为阳性。