

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/68 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03817437.5

[45] 授权公告日 2009 年 7 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 100507567C

[22] 申请日 2003.5.23 [21] 申请号 03817437.5  
[30] 优先权  
[32] 2002. 5. 23 [33] US [31] 60/383,180  
[32] 2003. 5. 23 [33] US [31] 10/444,606  
[86] 国际申请 PCT/US2003/016347 2003.5.23  
[87] 国际公布 WO2003/100080 英 2003.12.4  
[85] 进入国家阶段日期 2005.1.21  
[73] 专利权人 奥索临床诊断有限公司  
地址 美国纽约州  
[72] 发明人 R·W·范霍尔滕  
S·M·奥滕里思  
[56] 参考文献  
WO0043782A2 2000.7.27  
US6270672B1 2001.8.7  
US6221614B1 2001.4.24

审查员 程心旻

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 郭广迅 刘 玥

权利要求书 6 页 说明书 28 页 附图 1 页

[54] 发明名称

朊病毒蛋白的去除

[57] 摘要

用于制备生物溶液如基本上无异常朊病毒蛋白的免疫球蛋白和尤其是由此获得的抗-D 免疫球蛋白的方法。特别提供用于朊病毒凝集和生物溶液深度过滤以捕获和去除异常以及如果需要,正常朊病毒蛋白的方法。朊病毒蛋白可随后从深度过滤器和滤器洗涤物中洗脱以及浓缩至足以达到已有测定法能检测的程度。

1. 从含有生物或食品制品的水样液体中去除朊病毒的方法，其包括：

- (a) 使水样液体和一种或多种凝集作用辅助剂混合；和
- (b) 通过滤器过滤步骤 (a) 的混合物由此去除朊病毒蛋白；

其中所述凝集作用辅助剂不固定在固体表面。

2. 权利要求 1 的方法，其中朊病毒蛋白为正常朊病毒蛋白、异常感染性朊病毒蛋白，或正常和异常感染性朊病毒蛋白的混合物。

3. 权利要求 2 的方法，其中生物制品选自全血，血液组分，尿，脑脊液，包含白蛋白、免疫球蛋白及其片段的液体，凝血因子，血红蛋白， $\alpha$ -2-巨球蛋白，半抗原球蛋白，转铁蛋白，载脂蛋白，蛋白 C，蛋白 S，C-1-酯酶抑制剂，酶，间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂，生长激素和冯·威利布兰德因子。

4. 权利要求 3 的方法，其中凝血因子选自因子 IX、凝血酶、纤连蛋白、纤维蛋白原、因子 VIII、II、VII、IX、X、XI 和 XIII。

5. 权利要求 1 的方法，其中食品包含食物和饮料。

6. 权利要求 3 的方法，其中血液组分包含血清和血浆。

7. 权利要求 3 的方法，其中免疫球蛋白为多克隆的或单克隆的。

8. 权利要求 7 的方法，其中免疫球蛋白为 IgG。

9. 权利要求 8 的方法，其中 IgG 免疫球蛋白为 IgG 抗-D 免疫球蛋白。

10. 权利要求 9 的方法，其中权利要求 9 的 IgG 免疫球蛋白在包含 4.0% 至 6.0% 重量比的免疫球蛋白和 80 至 200ppm 聚山梨酯 80 的药物组合物中。

11. 权利要求 3 的方法，其中一种或多种凝集作用辅助剂混合在一起或依次使用。

12. 权利要求 11 的方法，其中一种或多种凝集作用辅助剂包含低介电常数的有机溶剂。

13. 权利要求 12 的方法，其中有机溶剂选自丙酮和水易溶的醇。

14. 权利要求 12 的方法，其中有机溶剂选自乙醇、甲醇、异丙基、异丙醇、n-丙醇、异丙醚、酮和醛。

15. 权利要求 14 的方法，其中醇为浓度为 2% 至 100% 的乙醇或

甲醇。

16. 权利要求 11 的方法，其中一种或多种凝集作用辅助剂选自硫酸胺、辛酸、三氯乙酸 (TCA)、双醛、杂多酸、乳酸盐单水合物 ( $C_{18}H_{21}N_3O_4H_2O$ )，以及金属离子  $Cu^{2+}$ 、Ni、Zn 和 Ag。

17. 权利要求 11 的方法，其中当朊病毒蛋白包含异常朊病毒蛋白时，一种或多种凝集作用辅助剂为复合剂。

18. 权利要求 17 的方法，其中复合剂选自杂多钼酸盐、杂多钨酸盐、磷酸钨酸钠 (NaPTA)、抗体、酶和肽。

19. 权利要求 11 的方法，其中滤器为膜或深度过滤器。

20. 权利要求 19 的方法，其中滤器为深度过滤器。

21. 权利要求 19 的方法，其中滤器具有的孔径能使小于  $6\mu m$  的产生滞留。

22. 权利要求 21 的方法，其中滤器具有的孔径能使 0.6 至 1.5 微米的产生滞留。

23. 权利要求 20 的方法，其中深度滤器具有的孔径能使小于  $0.6\mu m$  的产生滞留。

24. 权利要求 23 的方法，其中生物蛋白从其起始生物状态的回收维持至少超过 50% 的水平。

25. 权利要求 23 的方法，其中异常感染性朊病毒蛋白达到至少  $10^{2.5}$  的程度。

26. 纯的药物组合物，其包含按照权利要求 25 的方法制备的用于注射的异常感染性朊病毒清除的免疫球蛋白。

27. 权利要求 26 的纯的药物组合物，其中免疫球蛋白为 IgG 抗-D 免疫球蛋白。

28. 权利要求 27 的纯的药物组合物，其中 IgG 抗-D 免疫球蛋白在包含 4.0% 至 6.0% 重量比的免疫球蛋白和 80 至 200ppm 聚山梨酯 80 的药物组合物中。

29. 用于非治疗目的的从全血中去除朊病毒蛋白的方法，其包括：

- (a) 临床离心血液以由此分离红细胞和血小板；
- (b) 从红细胞和血小板倾析出步骤 (a) 离心的上清液；
- (c) 使上清液和一种或多种凝集作用辅助剂混合；
- (d) 通过膜或深度过滤器过滤步骤 (c) 的混合物，由此从滤液

中去除朊病毒蛋白；和

(e) 将步骤(a)分离的红细胞和血小板加回滤液中；

其中所述凝集作用辅助剂不固定在固体表面。

30. 权利要求 29 的方法，其中凝集作用辅助剂混合在一起或依次使用。

31. 权利要求 30 的方法，其中一种或多种凝集作用辅助剂包含低介电常数的有机溶剂。

32. 权利要求 31 的方法，其中有机溶剂选自丙酮和水易溶的醇。

33. 权利要求 31 的方法，其中有机溶剂选自乙醇、甲醇、异丙基、异丙醇、n-丙醇、异丙醚、酮和醛。

34. 权利要求 33 的方法，其中醇为浓度为 2% 至 100% 的乙醇或甲醇。

35. 权利要求 30 的方法，其中一种或多种凝集作用辅助剂选自硫酸胺、辛酸、三氯乙酸(TCA)、双醛、杂多酸、乳酸盐单水合物( $C_{18}H_{21}N_3O_4H_2O$ )，以及金属离子  $Cu^{2+}$ 、Ni、Zn 和 Ag。

36. 权利要求 29 的方法，其中当朊病毒蛋白包含异常朊病毒蛋白时，一种或多种凝集作用辅助剂为复合剂。

37. 权利要求 36 的方法，其中复合剂选自杂多钼酸盐、杂多钨酸盐、磷酸钨酸钠(NaPTA)、抗体、酶和肽。

38. 权利要求 29 的方法，其中滤器为膜或深度过滤器。

39. 权利要求 38 的方法，其中滤器为深度过滤器。

40. 权利要求 39 的方法，其中滤器具有的孔径能使小于  $6\mu m$  的产生滞留。

41. 权利要求 40 的方法，其中滤器具有的孔径能使 0.6 至 1.5 微米的产生滞留。

42. 权利要求 39 的方法，其中深度过滤使用具有的孔径能使小于  $0.6\mu m$  的产生滞留的深度滤器进行。

43. 一种用于生物或食品制品的水样液体中与 TSEs 相关的异常感染性朊病毒蛋白的捕获、洗脱、浓缩和定量的非治疗目的的方法，其包括：

(a) 使水样液体和一种或多种凝集作用辅助剂混合；

(b) 通过滤器过滤步骤(a)的混合物由此去除朊病毒蛋白；

(c) 从滤器洗脱朊病毒; 和

(d) 用测定法定量异常朊病毒蛋白;

其中所述凝集作用辅助剂不固定在固体表面。

44. 权利要求 43 的方法, 其中生物制品选自全血, 血液组分, 尿, 脑脊液, 包含白蛋白、免疫球蛋白及其片段的液体, 凝血因子, 血红素,  $\alpha$ -2-巨球蛋白, 半抗原球蛋白, 转铁蛋白, 载脂蛋白, 蛋白 C, 蛋白 S, C-1-酯酶抑制剂, 酶, 间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂, 生长激素和冯·威利布兰德因子。

45. 权利要求 44 的方法, 其中凝血因子选自因子 IX、凝血酶、纤连蛋白、纤维蛋白原、因子 VIII、II、VII、IX、X、XI 和 XIII。

46. 权利要求 43 的方法, 其中食品包含食物和饮料。

47. 权利要求 44 的方法, 其中血液组分包含血清和血浆。

48. 权利要求 44 的方法, 其中免疫球蛋白为多克隆的或单克隆的。

49. 权利要求 48 的方法, 其中免疫球蛋白为 IgG。

50. 权利要求 49 的方法, 其中 IgG 免疫球蛋白为 IgG 抗-D 免疫球蛋白。

51. 权利要求 50 的方法, 其中权利要求 50 的 IgG 抗-d 免疫球蛋白在包含 4.0% 至 6.0% 重量比的免疫球蛋白和 80 至 200ppm 聚山梨酯 80 的药物组合物中。

52. 权利要求 43 的方法, 其中一种或多种凝集作用辅助剂混合在一起或依次使用。

53. 权利要求 52 的方法, 其中一种或多种凝集作用辅助剂包含低介电常数的有机溶剂。

54. 权利要求 53 的方法, 其中有机溶剂选自丙酮和水易溶的醇。

55. 权利要求 53 的方法, 其中有机溶剂选自乙醇、甲醇、异丙基、异丙醇、n-丙醇、异丙醚、酮和醛。

56. 权利要求 55 的方法, 其中醇为浓度为 2% 至 100% 的乙醇或甲醇。

57. 权利要求 52 的方法, 其中一种或多种凝集作用辅助剂选自硫酸胺、辛酸、三氯乙酸(TCA)、双醛、杂多酸、乳酸盐单水合物( $C_{18}H_{21}N_3O_4H_2O$ ), 以及金属离子  $Cu^{2+}$ 、Ni、Zn 和 Ag。

58. 权利要求 52 的方法, 其中当朊病毒蛋白包含异常朊病毒蛋白

时, 一种或多种凝集作用辅助剂为复合剂。

59. 权利要求 58 的方法, 其中复合剂选自杂多钼酸盐、杂多钨酸盐、磷酸钨酸钠 (NaPTA)、抗体、酶和肽。

60. 权利要求 52 的方法, 其中滤器为膜或深度过滤器。

61. 权利要求 60 的方法, 其中滤器为深度过滤器。

62. 权利要求 60 的方法, 其中滤器具有的孔径能使小于  $6\mu\text{m}$  的产生滞留。

63. 权利要求 62 的方法, 其中滤器具有的孔径能使 0.6 至 1.5 微米的产生滞留。

64. 权利要求 61 的方法, 其中深度滤器具有的孔径能使小于  $0.6\mu\text{m}$  的产生滞留。

65. 权利要求 64 的方法, 其中生物蛋白从其起始生物状态的回收维持至少超过 50% 的水平。

66. 权利要求 64 的方法, 其中异常感染性朊病毒蛋白达到至少  $10^{2.5}$  的程度。

67. 权利要求 43 的方法, 其中洗脱包含用洗脱缓冲液对滤器的温和洗涤。

68. 权利要求 67 的方法, 其中洗脱缓冲液包含高渗溶液。

69. 权利要求 68 的方法, 其中高渗溶液包含高渗盐溶液。

70. 权利要求 69 的方法, 其中高渗盐溶液选自 1.0-2.0M NaCl 缓冲液, 和浓度为 1.0M 至 2.0M 的醋酸钠-甲醇缓冲液。

71. 权利要求 43 的方法, 其另外在步骤 (c) 和 (d) 之间包含一附加步骤, 其包括浓缩洗脱缓冲液中的朊病毒至适于用已有的测定法定量的数量。

72. 权利要求 71 的方法, 其中步骤 (c) 和 (d) 之间的浓缩步骤包含离心洗脱缓冲液中的朊病毒。

73. 权利要求 43 的方法, 其中定量步骤 (d) 包含使用有效的测定法, 其选自 ELISA、SDS-Page、蛋白质印迹法、EG&G Wallac、DELFIA、Prionics 测定法、Enfer ELC ELISA、CEA ELISA、构象依赖的测定法、DELFIA 和毛细管电泳。

74. 权利要求 43 的方法, 其中定量步骤 (d) 包含使用抗体测定法, 其使用朊病毒抗体 6H4、3F4、16A18 或 12A5。

75. 从包含 IgG 抗-D 免疫球蛋白的水样药物组合物中去除朊病毒蛋白的方法,其中药物组合物包含 4.0% 至 6.0% 重量比的免疫球蛋白,和 80 至 200ppm 的聚山梨酯 80, 其包括:

(a) 使水样组合物和 2% 至 10% 的甲醇混合; 和

(b) 通过具有的孔径能使小于  $0.6\mu\text{m}$  的产生滞留的深度过滤器过滤步骤 (a) 的混合物,

由此去除朊病毒蛋白, 其中生物蛋白从其起始生物状态的回收维持至少超过 50% 的水平, 且其中异常感染性朊病毒蛋白达到至少  $10^{2.5}$  的程度。

76. 纯的药物组合物, 其包含按照权利要求 75 的方法制备的用于注射的异常感染性朊病毒清除的免疫球蛋白。

77. 从全血去除朊病毒蛋白的非治疗目的的方法, 其包括:

(a) 临床离心血液以由此分离红细胞和血小板;

(b) 从红细胞和血小板倾析出步骤 (a) 离心的上清液;

(c) 使上清液和甲醇混合;

(d) 通过具有的孔径能使 0.6 至 1.5 微米的产生滞留的深度过滤器过滤步骤 (c) 的混合物, 由此从滤液中去除朊病毒蛋白; 和

(e) 将步骤 (a) 分离的红细胞和血小板加回滤液中。

## 朊病毒蛋白的去除

### 发明背景

可传染的海绵状脑病 (TSEs) 是由在中枢神经系统 (CNS) 中的进行性痴呆、共济失调、淀粉样斑形成和海绵状变性表征的神经变性疾病的集合 (Prusiner, S. B., 1993, Dev. Biol. Stand. 80, 31-44)。如今该疾病的致病因子认为是异常的朊病毒蛋白。TSEs 的基本特征, 如人类的克雅病 (CJD)、牛的牛海绵状脑病 (BSE) 以及绵羊的瘙痒病为正常细胞朊病毒蛋白  $\text{PrP}^c$  向致病型  $\text{PrP}^{sc}$  的转变。朊病毒感染的动物脑中  $\text{PrP}^{sc}$  的积累与感染性朊病毒效价的提高相关, 且可用作朊病毒病的诊断标记。由于 BSE 向人类的种间传播的威胁, 大量家畜必须测试脑中或其他合适的材料中  $\text{PrP}^{sc}$  的存在。在能使  $\text{PrP}^{sc}$  和  $\text{PrP}^c$  区分的共价修饰缺乏时, 利用  $\text{PrP}^{sc}$  而不是  $\text{PrP}^c$  具有部分蛋白酶抗性的事实,  $\text{PrP}^{sc}$  在蛋白酶 K (PK) 处理的组织匀浆中通过蛋白质印迹法或酶联免疫吸附试验 (ELISA) 常规检测。特别地, 这些目前所用的测定法没有利用  $\text{PrP}^{sc}$  形成凝集物的事实。如今确信具有去污剂抗性的  $\text{PrP}^{sc}$  凝集物的形成是  $\text{PrP}^{sc}$  通常的生化特性, 即使是对于那些  $\text{PrP}^{sc}$  对蛋白分解消化敏感的极少的朊病毒株。凝集作用在朊病毒暴露于凝集作用辅助剂, 例如包括复合剂时发生。

致死的人神经变性疾病 CJD 也通过一系列途径送原性地传播, 其暗示致病因子也可以通过血制品传播的可能性。一种人 TSE 新型的鉴定, 命名为“变体” CJD (vCJD), 其与牛海绵状脑病 (BSE) 因子有关的证实以及在人组织中 vCJD 因子的分布可能与经典的 CJD 不同的证据揭示了血或血制品可以传播  $\text{PrP}^{sc}$  的理论风险的存在 (参见 Turner 等., Blood Reviews 1998; 12:255-68)。

许多血制品从包含正常或特殊的免疫球蛋白、凝固因子浓缩物和白蛋白溶液的人血浆供体库中制备用于医药用途。现在有一个值得关注的关于从人或动物来源的生物医药产品可能传播 TSEs 可能性的忧虑。人血浆蛋白的肠胃外施用固有地带有疾病传播的风险。现有的血浆筛选和处理步骤以去除或灭活病毒的技术已经大大提高这些产品的

安全性，这方面参见 Burnouf T, 等., Blood Reviews 2000; 14: 94-110。然而，对异常的 PrP<sup>sc</sup> 合适的筛选测验仍旧没有得到发展，其对化学或物理的灭活方法具有极端的抗性。为确定 vCJD 已通过源于该血浆的产品传播到病人的概率，有必要确定 PrP<sup>sc</sup> 在临床相关环境中的传播力、对血浆分离物使用的操作能从血浆产品中去除 PrP<sup>sc</sup> 的程度以及在生物制品中用有效的测定法检测因子 PrP<sup>sc</sup> 的程度。

人血浆随着大量细胞碎片的去除而从全血中获得。最近的由血浆分离产业作的研究表明在人血浆产品制造中使用的加工步骤可减少 PrP<sup>sc</sup> (参见 Foster P., Trans. Med. 1999, 9: 3-14; Lee DC 等., J. Virol. Methods 2000, 84: 77-89; Foster P. 等., Vox Sang 2000, 78: 86-95, and Lee D. 等., 输血. 2001, 41: 449-55)。这些加工步骤包括 Cohn 分离、深度过滤和层析。Foster 等 (Vox Sang, supra.) 证实深度过滤对于从免疫球蛋白和白蛋白中去除大量的异常朊病毒蛋白 (PrP<sup>sc</sup>) 是有效的。

因此有必要发展有效的从动物或人来源的医药产品或食品中捕获和去除异常的感染性朊病毒而基本上没有降低和/或去除产品的生物学活性或食品价值的方法。因目前异常朊病毒检测和定量的方法的限制，在浓缩至上述检测限以上以及随后从样品中检测和精确定量异常的朊病毒蛋白 (PrP<sup>sc</sup>) 的能力上存在未解决的需求。

本发明是基于令人惊讶的发现，即包含生物制品，如生物活性蛋白的水样液体，用一个或多个具有孔径小于约 6 微米的深度过滤器的深度过滤对去除异常感染性朊病毒蛋白是非常有效的。更具体而言，本发明人做了令人惊讶的发现，即包含生物制品，如生物活性蛋白的水样液体，在凝集作用辅助剂处理后，用一个或多个具有孔径小于约 6 微米的深度过滤器的深度过滤对去除异常感染性朊病毒蛋白是非常有效的。

本发明提供了与 TSEs 相关的 PrP<sup>sc</sup> 的捕获、去除、浓缩和随后的精确定量的方法，而该 TSEs 包含于生物或食物制品中。

尤其是，本发明提供了与 TSEs 相关的 PrP<sup>sc</sup> 的捕获、去除、浓缩和随后的精确定量的方法，该 TSEs 在生物制品中，已用一种或几种凝集作用辅助剂处理而导致 PrP<sup>sc</sup> 的凝集，使得可在过滤器中或上捕获 PrP<sup>sc</sup>。任何能导致凝集作用的方法可如此处考虑的凝集作用辅助剂一

样而应用。尤其是，已发现溶剂如醇可被应用。在本发明的方法中，凝集作用辅助剂如已与生物学或食物产品混合的液体溶剂通过过滤器，过滤器由硅藻土或类似的过滤材料浸制的纤维素基质形成，可用阳离子树脂包被而使过滤器的平均孔径为约 0.1 微米至约 6 微米。一般，过滤器为一次性使用的过滤器。

尤其是，本发明提供了与 TSEs 相关的 PrP<sup>sc</sup> 的捕获、去除、浓缩和随后的精确定量的方法，该 TSEs 在生物制品中，已用一种或几种凝集作用辅助剂如溶剂，例如醇、醇分离的免疫球蛋白溶液，其包括将含有生物或食物制品的溶剂液体通过深度过滤器，该过滤器由包含多孔材料的固体颗粒的基质形成，且具有的孔径能使小于约 6 μm 的产生滞留。一般，过滤器为一次性使用的过滤器。用凝集作用辅助剂的处理可由一种或多种辅助剂混合使用或依次使用完成。

术语“去除”或“捕获”理解为从含有目的蛋白的液体中 PrP<sup>sc</sup> 确实的物理去除。因实际的目的，目的蛋白从其起始生物状态的回收应当基本上维持至少超过 50% 的水平，优选 80%，更优选 >90%。

使用本发明的方法，异常的感染性朊病毒蛋白的去除可达到至少  $10^{2.5}$ 、 $10^3$ 、优选  $10^4$ 、更优选  $>10^5$ 。

除了从生物或食物制品中去除感染性 PrP<sup>sc</sup>，本发明还涉及从一种或多种过滤器上洗脱及随后用洗脱缓冲液对捕获的和已洗脱的 PrP<sup>sc</sup> 的浓缩，缓冲液可包含，例如，高渗溶液如高盐溶液以使 PrP<sup>sc</sup> 可用有效的测定法精确定量。

因此，本发明提供了朊病毒的凝集以及随后为纯化生物或食物制品而进行的过滤、朊病毒从过滤器上的洗脱及 PrP<sup>sc</sup> 的浓缩，以使本领域技术人员能应用有效的测定法对生物或食物样品中的总朊病毒和 PrP<sup>sc</sup> 定量。本发明还进一步提供对大量样品的 PrP<sup>sc</sup> 快速高通量的检测。

本发明还涉及已处理的生物或食品溶液。

由于人血浆的来源为大量细胞组分去除后的全血，因此，为了模拟所期望的 TSE 因子在血浆中的状态用于分离，在此使用瘙痒病感染的仓鼠脑部分作为接种物，其中完整的细胞和更大的碎片已被去除。已确信 TSE 疾病可通过蛋白酶 K 抗性、构象异常的朊病毒蛋白 (PrP<sup>sc</sup>) 传播。在此，我们公开了一种体外分析方法，用以确定作为 vCJD 的分

布标记的仓鼠适合的瘙痒病 PrP<sup>sc</sup> 的分布。

TSE 因子对灭活作用有高抗性,因此任何产品相关风险的降低将依赖于产品制造过程中感染性材料的物理去除。血浆产品制造中使用的加工技术包括通过沉淀和层析而使蛋白分离和通过深度和膜过滤步骤而使最终蛋白溶液得到澄清和灭菌的各自进行。一些技术,通过用本发明的方法对其改进,可从产物流中去除 TSE 因子。

在此 PrP 蛋白用对仓鼠 PrP 特异的单克隆抗体 3F4 的蛋白质印迹法检测。该抗体仅与人、仓鼠和猫的 PrP109-112 残基反应。与 3F4 抗体在 0.6 μg/ml 浓度下至少孵育 1 小时,随后过量抗体被洗去且膜用兔抗鼠的辣根过氧化物酶结合物(1:1000 稀释)孵育至少 1 小时。在多次用 TTBS 洗涤后,膜用增强的化学发光剂显影。

在代理商制造 RhoGAM®RHO(D)免疫球蛋白(人)过程中,PrP<sup>sc</sup> 在深度过滤步骤时被去除至检测限,该步骤也在免疫球蛋白的制造过程中使用。

蛋白质印迹法是用于鉴定和表征 PrP<sup>sc</sup> 的方法。PrP<sup>sc</sup> 通过提取而分离且通过对蛋白酶 K 消化的部分抗性而区分。PrP<sup>RES</sup> (对蛋白酶消化具抗性的 PrP<sup>sc</sup>) 通过糖基化形式和片段的迁移位点而得到鉴定。该测定法的灵敏度低于感染性测定法灵敏度约 3 个数量级(logs)。灵敏度问题可通过离心酶消化制备物、去除上清和重悬朊病毒物质于较小体积、形成朊病毒物质的浓缩物而部分克服。我们已表明朊病毒可通过在用凝集作用辅助剂处理后通过过滤器而过滤,以及随后通过洗脱而收集于小体积而很容易地浓缩。该技术可用于从产品流中大规模地去除朊病毒。

该操作将对免疫蛋白印迹法和事实上任何其他朊病毒检测测定法用于测定生物基质中 PrP<sup>sc</sup> 的存在产生主要的影响。本发明允许 TSE 材料得到快速定量浓缩以增强检测。当想要纯化 PrP<sup>sc</sup> 的生物、食品或化妆品溶液时,本发明在该生物、食品或化妆品溶液易于通过大的额定孔径过滤器而过滤方面具有优势。

本发明的方法在通过去除、洗脱 PrP<sup>sc</sup> 和进一步定量 PrP<sup>sc</sup> 而对生物、食物和化妆品处理方面是有用的,所述的处理有赖于所用的凝集作用辅助剂。可经过如此处理的生物材料为血和血液组分如,全血、血清、血浆、尿、脑脊髓液和血液来源的生物制品如抗体和免疫球蛋白。

白。该抗体的一种为已知的单克隆的抗-D 免疫球蛋白或 RhoGAM® Rho(D)免疫球蛋白(人)。该多克隆的免疫球蛋白用于新生儿溶血疾病的预防,其中母亲感染了人源的 Rho(D)免疫球蛋白。该产品称为 RhoGAM®,可从其代理商处获得,且它通过预防未受免疫的 Rho(D)阴性母体免于对红细胞上的和从 Rho(D)阳性婴儿“接受的”Rho(D)抗原产生免疫应答而起作用。因此,通过母体预防抗 Rho(D)产生,该母体随后的 Rho(D)阳性婴儿就可免于新生儿溶血疾病。该有用的产品目前通过 Cohn 醇分馏类型的方法生产。

RhoGAM®Rho(D)免疫球蛋白(人)是获得抗体介导的免疫抑制的首次成功预防应用的特异抗体。RhoGAM®是一种含有每剂量 300 微克抗-D 活性剂量的抗-Rho(D)的 IgG 免疫球蛋白溶液。RhoGAM®可在适当的时间给予未受免疫的、Rho(D)阴性妊娠妇女以预防其 Rho(D)阳性后代中未来的疾病。该疾病称为新生儿溶血疾病或更特定地,Rh-胎儿成红细胞增多病。

更小剂量的抗-Rho(D),MICRhoGAM® Rho(D)免疫球蛋白(人)微-剂量(50 微克抗-Rho(D))也由其代理商销售,用于治疗在 12 周妊娠期或更早时堕胎和流产的妇女。受体保护的全剂量为 15ml Rho(D)阳性红细胞,而提供保护的更小剂量为 2.5ml Rho(D)阳性红细胞。RhoGAM®在 26 至 28 周妊娠期用作出生前的预防。其他适应症包括继续妊娠时在妊娠任何时期的先兆流产、在妊娠 13 周或之前的流产或妊娠终止、腹部创伤或遗传羊膜腔穿刺术、绒毛活检(CVS)和经皮的脐带血活检(PUBS)。

大部分经 FDA 和生物局批准应用的可注射免疫球蛋白物质已通过醇分馏方法而生产,其由哈佛的 E. Cohn 博士开发且在 Cohn 等., J. Am. Chem. Soc. 68, 459 (1946)中描述,在此引入作为参考。该方法与肝炎病毒、HIV,和其他血源性病原体阴性血浆的谨慎选择联合使用,该选择通过最灵敏有效的测试来测定。由该方法生产的产品的是安全的可很容易地由数百万未受感染的产品接受者来证实。发明人发现在上述参考的 Cohn 方法中使用的醇足以作为一种凝集作用辅助剂,其引起足够数量的 PrP<sup>sc</sup> 颗粒凝集,致使 PrP<sup>sc</sup> 可被去除至使用本发明的深度过滤器检测的限度,以及 PrP<sup>sc</sup> 可被洗脱和浓缩至足以用于该检测的水平。

所用的溶剂组合物对 IgG 颗粒只有极小的影响，但足以凝集 PrP<sup>sc</sup> 至其可被去除至低于用有效的测定法所能测定的水平。

因此，本发明的一个目的是提供使用朊病毒凝集作用辅助剂和膜或深度过滤器从生物或食物制品中去除 PrP<sup>sc</sup> 和如果需要，PrP<sup>c</sup> 的方法。深度过滤器优选使用。

本发明的另一个目的是在没有对蛋白的自然或生物学活性产生不可接受的影响下，从含有蛋白的，尤其是那些来源于人血浆的液体中去除 PrP<sup>sc</sup> 和如果需要，PrP<sup>c</sup> 的方法。

本发明进一步的目的是使用此处公开的方法从任何生物液体中捕获、浓缩和精确定量检测 PrP<sup>sc</sup>。

本发明的一个目的是提供用于注射的异常感染性朊病毒清除的，纯的免疫球蛋白。该基本上纯的产品用本发明的方法生产。

本发明进一步的目的是提供从异常的感染性朊病毒中纯化免疫球蛋白的制造方法，其适于即时的、令人满意速度和蛋白产量的需求。

本发明进一步的目的是提供深度过滤器，其可为单次使用的过滤器，在从方法流程中去除 PrP<sup>sc</sup> 后可被抛弃。

本发明进一步的目的是通过从深度过滤器和过滤器洗涤物中洗脱所述朊病毒而提供浓缩的 PrP<sup>sc</sup> 溶液。

本发明另一更进一步的目的是提供一种快速测定法用于评估在包含生物液体和人血和血浆来源的产品的不同生物样品中的 PrP<sup>sc</sup>。该测定法的使用，如，蛋白质印迹法，需要在未朊病毒凝集、未过滤的生物溶液中不能利用的朊病毒达到足够的水平。该方法提供了一种捕获、洗脱和浓缩朊病毒以使其可用目前有效的测定法检测的实用方法。这些新的捕获和洗脱方法的使用提高了约 3 个数量级灵敏度，使得能够降低所需体积而实施该检测测定法。

### 发明概述

本发明的方法用于生产基本上纯化的异常朊病毒蛋白的免疫球蛋白（优选单克隆的）。基本上纯化的免疫球蛋白为例如单克隆或多克隆抗-D 免疫球蛋白，如 RhoGAM® 或 MICRhoGAM®。该免疫球蛋白制剂包含约 4.0% 至 6.0% 重量比的免疫球蛋白，和从约 80 至 200ppm 的聚山梨酯 80，更优选约 5.0% 重量比的免疫球蛋白和约 130ppm 的聚山梨

酯 80。

上述引用的免疫球蛋白制剂通常通过使用凝集作用辅助剂如醇分馏人血浆的步骤制得，其中分馏包含过滤步骤；重悬所得到的沉淀物 II；用含有赋形剂的高离子强度缓冲液与重悬的沉淀物 II 混合；和对免疫球蛋白进行毫微过滤。

醇可优选甲醇且在分馏过程中对上清液 III 实施过滤步骤，可用深度过滤器如 Cuno Zeta Plus 90S 深度过滤器。

该方法公开了对异常朊病毒蛋白基本上纯的抗-D 抗体的制造方法，包括在凝集作用辅助剂如醇存在时分馏人血浆，其中分馏包含过滤步骤。该过滤步骤可使用深度过滤器如 Cuno Zeta Plus 90S 深度过滤器，其孔径值为约 0.6 至 6 微米。得到的上清液，在分馏过程中作为“上清液 III”提及，经处理形成沉淀物（在方法中称“沉淀物 II”），其随后重悬且与处理辅助剂混合，之后立即对得到的抗-D 抗体实施毫微过滤。该处理辅助剂包括高离子强度缓冲液和非离子赋形剂，例如 150mM NaCl-甘氨酸缓冲液和聚山梨酯 80。

在此进一步公开了对异常朊病毒蛋白基本上净化了的生物制品的制造方法，其通过将生物制品与凝集作用辅助剂如足以形成凝集的异常或正常朊病毒蛋白的溶剂混合；以及用深度过滤器过滤由此得到的混合物而进行。该生物制品为血或血制品、脑脊液或尿。当制品为血时，血液首先经临床离心，在与凝集作用辅助剂混合前红细胞和血小板从血液中去掉。在过滤步骤后，红细胞和血小板加回血液中。深度过滤器可包括例如 Cuno Zeta Plus 90S 深度过滤器。凝集作用辅助剂可以是醇，如浓度为约 2% 至约 100% 的乙醇或甲醇。

另外在此进一步公开了在生物溶液中定量异常朊病毒的方法。该方法包括将生物溶液与凝集作用辅助剂如足以凝集异常朊病毒蛋白的溶剂混合、用深度过滤器过滤混合物、通过用洗脱缓冲液冲洗过滤器而将异常朊病毒蛋白从深度过滤器上洗脱、任选地通过诸如离心的方法浓缩洗脱物和对洗脱缓冲液实施异常朊病毒蛋白的测定。生物溶液可以是血或血制品（例如免疫球蛋白）、脑脊液或尿。

#### 附图简述

图 1 为显示分馏人血浆以获得抗-Rh 球蛋白过程的流程图。在分馏

过程中材料经过滤以捕获朊病毒蛋白。

### 发明详述

本发明使用一种或多种凝集作用辅助剂以在液体中凝集朊病毒，致使朊病毒（正常和/或异常）可被洗脱、捕获、浓缩和检测。一类凝集作用辅助剂可在液体，如生物液体中凝集异常感染性朊病毒（PrP<sup>sc</sup>）和正常朊病毒，朊病毒凝集物可随后被去除、洗脱、浓缩，以及异常、正常或两种类型的朊病毒可用本发明的方法精确定量。

本发明进一步涉及其为复合剂的凝集作用辅助剂的用途，该制剂凝集正常或异常朊病毒依赖于该配位剂的特性。所述配位剂包括金属离子如例如 Cu<sup>2+</sup>、Ni、Zn 和 Ag。

本发明提供了过滤器例如用于包含球状蛋白质分子如免疫球蛋白或抗体的生物液体的深度过滤器，期间没有可察觉的产量损失和免疫球蛋白亚类、免疫球蛋白凝集水平或免疫球蛋白稳定性的显著变化。

本发明的方法生产出基本上无异常感染性朊病毒（PrP<sup>sc</sup>）和如果需要，正常朊病毒（PrP<sup>c</sup>）的生物液体。当凝集作用辅助剂选择适当时，本发明的凝集和过滤方法事实上可以确保所有分类学上可能的朊病毒，不管正常还是异常，从制品中去除。

该方法尤其适用于全血、血液组分（如，血清、血浆）、尿、CSF 或任何生物材料如含有白蛋白、免疫球蛋白（例如 IgG）和其片段的液体、凝血因子如因子 IX、凝血酶、纤连蛋白、纤维蛋白原、因子 VIII、因子 II、VII、IX 和 X 以及其他来源于血浆的蛋白的处理。其也适用于血浆、因子 XI、因子 XIII、血红素、 $\alpha$ -2-巨球蛋白、半抗原球蛋白（haptoglobin）、转铁蛋白、载脂蛋白、蛋白 C、蛋白 S、C1-酯酶抑制剂、酶（例如链激酶）、间（inter）- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂、生长激素和冯·威利布兰德因子的处理。上述天然存在的和重组类似物可得到处理。另外，本发明适用于其他天然制品包括食物、饮料、化妆品的处理。其还适用于其他非血浆动物来源制品，如肝素和激素的处理。

如此处所述，可用本发明的方法处理的生物液体包括血和血液组分如全血和其组分，包括血清和血浆、尿、脑脊液，和任何生物制品如抗体和免疫球蛋白。本发明中处理和过滤的人血浆可通过 Cohn 等

(“Cohn 方法”)的分馏方法,上述作为参考,由批样或柱交换层析,或通过亲和层析而获得。在生产免疫球蛋白,特别是抗-D 免疫球蛋白如 RhoGAM Rho(D)免疫球蛋白(人)的方法中,普通转让的美国专利 No. 6,096,872(2000 年 8 月 1 日授予 Van Holten 等专利权)在此作为参考,其内容引入作为参考。

Cohn(美国专利 No. 2,390,074,其内容在此引入作为参考)公开了分馏血的方法,通过其制得  $\gamma$  球蛋白。由 Cohn 方法制得的  $\gamma$  球蛋白包含 19S 球蛋白、纤连蛋白原和脂类。虽然  $\gamma$  球蛋白非常适于预防诸如麻疹和破伤风疾病,19S 球蛋白、纤连蛋白原和脂类的存在却是非必要的污染物,且会降低其在预防免疫法中对胎儿红细胞 Rh-因子的效力。

由本发明有效的方法制造的基本上纯的抗-Rh 球蛋白从人血浆中制得,该血浆包含白蛋白、纤连蛋白原、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  球蛋白和各种脂类。特定地,本发明的抗 Rh-球蛋白为  $\gamma$  球蛋白。

为获得抗-Rh 球蛋白的人血浆分馏依照上述 Cohn 等,以及普通转让于 Pollack 等的美国专利 No. 3,449,314 的方法进行,该专利的教导在此引入作为参考。关于所附的流程图图 1,分馏人血浆的能力依赖于血浆中各种组分的溶解度。在分馏的每个时期,分馏组分的分离和抗-Rh 球蛋白中不需要的那些组分的最终去除通过 pH、温度、沉淀物的浓缩和系统离子强度的严格控制而确定。

各种凝集作用辅助剂可用于在本发明生物液体中驻留的朊病毒的凝集作用。有许多类的凝集作用辅助剂可使用,其发挥作用的原理为不发生凝集作用而改变朊病毒的特性(如,大小)或反之影响包含朊病毒的环境。

值得高兴的是一些凝集作用辅助剂可凝集异常和正常的朊病毒。此类凝集作用辅助剂包括低介电常数的有机溶剂,如丙酮和醇,其被熟知用于沉淀蛋白且已用于血浆分馏。更特别地,本发明方法中使用的有机溶剂包括各种醇类,其为彻底的水易溶的,以及不与蛋白反应的,如乙醇、甲醇、异丙基、异丙醇、n-丙醇、异丙醚、酮、醛等,和丙酮,优选甲醇。本类中可使用的其他类似凝集作用辅助剂,某种程度上能与受处理的生物材料共处,其包括硫酸胺、辛酸和化学制剂三氯乙酸(TCA)、双醛、杂多酸和乳酸盐单水合物  $C_{18}H_{21}N_3O_4H_2O$ 。

更令人高兴的是，某些凝集作用辅助剂可凝集异常朊病毒因而使其能被去除，而使正常朊病毒保留其原状态，反之亦然，该类凝集作用辅助剂为配位剂。这些配位剂与朊病毒结合，且包括杂多钼酸盐、杂多钨酸盐、磷酸钨酸钠（NaPTA）（所有只凝集异常朊病毒），和生物制剂如抗体（单克隆或多克隆），抗体的作用基于其特性，酶如纤连蛋白原（其只凝集异常朊病毒）和多肽，多肽的选择性作用基于其构成。更进一步的凝集作用辅助剂其为配位剂包括金属离子  $\text{Cu}^{2+}$ ，其凝集正常朊病毒。其他类似的金属离子可包括 Ni、Zn 和 Ag。这些制剂在结合在基底时可用作朊病毒捕获装置。在一实施方案中，涉及配位剂可系列使用，比方说，离子  $\text{Cu}^{2+}$  可与生物溶液混合，通过过滤将正常朊病毒去除，随后将所得的生物溶液过滤物和 NaPTA 混合以复合异常朊病毒，其可随后用已知的测定方法捕获、洗脱和浓缩以及检测。

凝集作用辅助剂甲醇因其相对于其他有机溶剂较低的毒性和操作安全性（如，爆炸危险）而首选用于去除免疫球蛋白溶液中的朊病毒。当使用此溶剂时，一般以与生物液体约 2% 至约 100% 的体积比浓度存在于与生物液体的混合物中。溶剂浓度通过最小的凝集朊病毒所需浓度来指示较低的范围，以及通过生物材料和过滤介质的完整性来指示较高的范围。

发明人已发现本发明的用诸如上述凝集作用辅助剂的处理导致朊病毒（ $\text{PrP}^{\text{sc}}$  和  $\text{PrP}^{\text{c}}$  之一或两者，基于应用时所用的凝集作用辅助剂和方法）蛋白的凝集，以及使用本发明方法时，所述凝集物可用过滤去除。然后，使用本发明的方法，包括过滤和随后从过滤器洗脱和过滤器洗涤，和如果需要，浓缩洗脱物， $\text{PrP}^{\text{sc}}$  可以以足以能精确定量的浓度获得。使用本发明的方法，已发现所述处理足以从免疫球蛋白制剂中去除  $\text{PrP}^{\text{sc}}$  至低于其检测限。用于检测所述朊病毒的测定法的灵敏度提高了约 3 个数量级，使得体积减少以及因此提高了样品中朊病毒的浓度。

为了本发明  $\text{PrP}^{\text{sc}}$  凝集作用方面，可使用的凝集作用辅助剂为任何已发现可沉淀异常感染性朊病毒蛋白原纤维的试剂，其能与受处理的生物材料相容，以及与所用的滤器相容。

本发明的过滤可在任何适合被过滤的生物材料的温度下进行，事实上过滤的环境由经过滤器的生物、食品或化妆品制品确定，而不是

捕获朊病毒物质所需的环境。为防止分馏和过滤中蛋白变性，应用的分馏和过滤可优选在低温下进行。由于蛋白溶解度是温度依赖性的，分馏的每个步骤温度的选择必须是最低可能的，其允许所需分离和/或过滤进行以防止变性。pH 环境应当由受纯化的生物制品的易感性确定。

本发明实际使用的深度过滤器为那些带电荷或不带电荷的深度过滤器。所使用的深度过滤器的实施例包括 Celite(World Minerals, Lompoc, CA)、Millipore 过滤器 75DE 和 SA (Millipore 公司, Bedford, MA), 和 Cuno 35P 和 Cuno Zeta Plus 90SP (Cuno 公司, Meriden, CT)。

最优选在本发明中使用的为 47mm Cuno Zeta Plus 90SP 深度过滤器，带有适当的不锈钢过滤套，用于小规模过滤作业，以及在制造过程中使用的 16 平方英尺的筒。本发明实际使用的过滤器优选深度过滤器，然而非-深度过滤器也可用于去除凝集的 PrP<sup>sc</sup>，只要过滤物经过过滤器时没有导致滤器的堵塞。所述替代滤器例如有薄膜滤器，带电荷或不带电荷。所述滤器包括例如，一次性注射器滤器 Swinex 或 Millex 25mm PVDF 注射器驱动的过滤单元、0.22 微米 Opticap 和 Optiseal 筒(Millipore 公司, Bedford MA)。

在实际去除和捕获本发明的 PrP<sup>sc</sup> 凝集物中使用滤器的孔径相对不重要，然而孔径可影响过滤的生物制品的回收。过滤基质的孔径优选在 0.2 至 6 微米的范围，特别是 0.6 至 1.5 微米。孔径以其上滞留颗粒的颗粒大小的方式来定义。一般已定义大小的颗粒如右旋糖酐或微生物用于校准目的。

在本发明基本上纯的、无异常感染性朊病毒免疫球蛋白制品的生产中应用的过滤单元的孔径小于约 6  $\mu\text{m}$ ，最优选小于约 0.6  $\mu\text{m}$ 。然而任何具有足以从蛋白质溶液中降低或消除异常感染性朊病毒的截留率滤器都可在本发明的处理方法中应用。例如，作为深度过滤器，Cuno Zeta Plus 90S 滤垫(Cuno 公司, Meriden, Conn.)可被应用，所述单元具有 0.1 至 5 微米范围的分子量孔径。

同样地，滤器组合物应当只对滤器捕获凝集的 PrP<sup>sc</sup> 的能力具有很小的影响，然而，朊病毒物质从所述滤器的回收将需要诸如高盐溶液或表面活性剂的洗脱缓冲液。

滤器材料可包含深度过滤器，其通常包含自身结合的纤维素基

质, 以及固体多孔微粒材料如 Kieselguhr、珍珠岩或硅藻土。

深度过滤器通常具有 1-10mm 范围的厚度, 尤其是 2-5mm。深度过滤器所用的材料应当对涉及的所需蛋白只有很小的或没有影响。合适的深度过滤器包括孔径为 0.6-1.5  $\mu\text{m}$  的 Seitz KS80、Seitz K200P、Cuno Delipid Del 1 小筒, 有效过滤范围为 27cm<sup>3</sup>、Millipore 滤器, 尤其是 Millipore CP20, 还包括常规的超过滤器, 如 Millipore PTHK 聚醚砜膜、AMICON ym-100 再生的纤维素超滤膜 (Millipore 公司, Bedford Mass.)、PALL Filtron Omega VR、Pall Ultrapore VFDV50 (Pall 公司, East Hills, NY), 和其他筒过滤器, 如 Asahi Planova 再生纤维素筒过滤器 (Asahi, Tokyo Japan)。其他可使用的过滤器为带电荷的深度过滤器如 E. Begerow GmbH & Co., Langenlonsheim, 德国。然而, 在此最优选的实施应用 Cuno Zeta Plus 90S 滤垫, 47 mm 过滤器。

生物材料通过过滤器的流速为那些适于确保生物材料适当过滤而不损害滤器完整性的流速, 或, 对于包含大量球状蛋白质的生物材料, 为不损害蛋白结构而使得制备物无法用于其接下来的目的的流速。例如在免疫球蛋白制剂的深度过滤中, 过滤速率范围从约 0.01 至约 20ml/min, 更优选约 10ml/min, 更优选约 1ml/min。

该方法可在 pH 范围 4-10, 优选 5-9, 更优选 6-8 中进行。然而 pH 范围由保持受处理生物材料完整性所需的 pH 和所用的滤器来确定, 而不受凝集或过滤操作本身的任何限制。

加热的应用是不必要的, 该方法可在基本上室温或更低温度下进行, 尤其是 -5 至 20℃ 的温度, 其适于维持生物材料和过滤介质的完整性。

如上所述, 本发明的一个方面是用凝集作用辅助剂对生物材料的处理, 该辅助剂为如足以凝集其中所含朊病毒而使其能通过过滤捕获和洗脱至用已知的方法如蛋白质印迹足以检测的浓度的溶剂。一些生物液体如此处理将作为其制品的一个参数, 例如, Cohn 方法中用醇处理的免疫球蛋白。当生物液体未经过如此处理, 它将用如上面所述的适当的凝集作用辅助剂来处理, 以凝集其中所含的朊病毒。所述生物液体为上面所列举的, 以及可包括血液及其组分、尿、脑脊液, 以及免疫球蛋白。

随着用凝集作用辅助剂处理生物材料，滤垫从套中除去以及朊病毒从其中洗脱，如果需要，用诸如离心的方法浓缩，且用有效的测定法定量，全部依照本发明的其他方面，所有的在此得到描述。

在感染朊病毒病的动物和人尿中存在一种蛋白酶抗性的朊病毒蛋白异构体。Shaked 等(2001, J. Biol. Chem. 276 (34): 31479-31482)详述了从尿中分离朊病毒的步骤。Shaked 等描述的方法需要 2-15ml 尿样品在 3000rpm 沉淀 5 分钟，随后在纤维素膜管中透析过夜。随后尿样品以高速 ( $100,000 \times g$ ) 在 4℃ 离心 1 小时。

Shaked 等的方法是费时的，且受易于浓缩的样品数量的限制。在此公开的为从生物液体如尿中精确定量朊病毒的方法，其可在几分钟内完成且不受体积的限制。在用本发明的方法从尿过滤和洗脱朊病毒时，尿体积达到 1 升都可用 47mmCuno 滤器过滤。相对于现有技术而言，体积的不同使得该方法在浓缩容量上有数量级上的提高。参见此处实施例 9。

本发明中当全血用作生物液体时，其一定数量，例如 1 升，可首先在适于分离细胞各组分的条件下离心。所得到的血浆与凝集作用辅助剂如一定量的甲醇，按照如约 5 份血浆和 1 份甲醇的比率混合以凝集朊病毒物质。混合物用旋转振荡器轻轻混合一段时间，足以凝集所在朊病毒，例如约 1(1)分钟。随后混物流经滤器如 47 mm Cuno Zeta Plus 90S 滤器。随后该物质用此处所述洗脱缓冲液从滤器上洗脱，且用任何适当的测定法定量朊病毒，如蛋白质印迹测定法。如果需要，该检测限可进一步由包括 PrP<sup>sc</sup> 沉淀的步骤来改进。样品被稀释且用蛋白酶-K (PK) 处理，随后用 AEBSF (4-(2-氯乙基) 苯磺酰氟化物) 抑制蛋白酶活性。随着 PK 的处理，样品在 4℃， $20,000 \times g$  离心 1 小时。沉淀物制备用于 SDS Page。

当用朊病毒凝集作用辅助剂处理的生物物质为免疫球蛋白时，该物质将在血浆分馏过程中达到如此的处理。关于此处的图 1 和实施例 1，将血浆单元混合，然后在特定条件下离心以及相关部分保留用凝集作用辅助剂作进一步处理，在这种情况下，优选甲醇。在获得上清液 III 的分馏时，上清液 III 用膜或深度过滤器过滤，其过滤去除其中可能含有的凝集朊病毒。因此获得的凝集朊病毒可从滤器洗脱以及用已知测定法检测和定量。

本发明的捕获和洗脱操作导致测定的检测限提高超过 100 倍，目前达到传染性测定法的检测限。用现有技术中已有的方法，传染性测定法依赖于所研究的种类需要数月才得到结果，相比较，使用本发明方法数小时产生结果。

随着驻留于生物液体的朊病毒的凝集，无论是通过溶剂还是其他方法，接下来的步骤为朊病毒（例如，PrP<sup>sc</sup>）的洗脱和回收。在这些步骤中滤器或滤垫被除去且用洗脱液洗涤。一种方法就是将垫放置在容器如培养皿、烧杯或类似合适的容器中，合适体积例如约 15ml 至约 100ml 的洗脱缓冲液加入其中，然后容器在室温下置于旋转振荡器上约 25 分钟。滤器结合的 PrP<sup>sc</sup> 因此通过用洗脱缓冲液温和的洗涤从中洗脱。合适的洗脱缓冲液包括任何水样缓冲液，如，高渗的盐溶液例如 1.0-2.0M 的 NaCl 缓冲液、浓度为 1.0M 至约 2.0M 的醋酸钠-甲醇缓冲液。

如果需要，凝集的朊病毒可由离心或现有技术中任何已知的方法进一步浓缩以获得更高的浓度。

考虑到血制品朊病毒污染的理论可能性，因此阐明深度过滤的有效性以及从免疫球蛋白制品 RhoGAM® Ultra-Filtered Rho(D)免疫球蛋白（人）的中间产物中去除朊病毒的机制就尤为重要。为完成该目标，发明人使用瘙痒病-感染的仓鼠来源的瘙痒病脑组织匀浆（SBH），作为 PrP<sup>sc</sup> 的来源。为实现该研究，PrP<sup>sc</sup> “活性种”首先用洗涤剂处理以溶解，随后超声波处理以裂解原纤维。该活性种得到处理以使得 PrP<sup>sc</sup> 小至能通过过滤系统。超声波处理的 SBH 随后用 0.45、0.22 和 0.1 微米的膜过滤，以便在掺加示踪剂之前更好地确定 PrP<sup>sc</sup> 活性种的大小。早先的研究（Van Holten R, 等., 输血（提交公开））表明该处理不会对 PrP<sup>sc</sup> 有不利影响，且另外确保深度过滤将要去除的颗粒和感染相关的单体原纤维大小更相近。深度过滤后 PrP<sup>sc</sup> 的减少表明朊病毒的去除归因于原纤维吸附在正电荷滤膜上，而不是机械过滤。将活性种加入到稀释在磷酸缓冲液/甲醇混合物中的 IgG 中导致形成絮状物质沉淀，其产生浑浊现象。

Cuno Zeta Plus SP 带电的深度过滤器用于过滤掺加入 SBH 的 RhoGAM® Rho(D)免疫球蛋白（人）。在经过 Zeta Plus SP 滤器过滤时，浑浊物被去除。一层白色沉淀可在过滤后的滤器上观察到。用蛋

白质印迹法检测 PrP<sup>RES</sup>，过滤的物质没有瘙痒病病毒。用 2.0M 盐洗涤液将朊病毒物质从过滤器上回收。蛋白质印迹的结果在此显示在表 1 中。

同时进行两个对照组。第一个对照组中，PrP<sup>sc</sup> 掺入的免疫球蛋白中间产物首先通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤以确保 PrP<sup>sc</sup> 没有凝集成大的颗粒而通过机械过滤由深度过滤器去除。第二组中，超声波处理和过滤的 SBH 掺入 Tris 缓冲液生理盐水而非免疫球蛋白中间产物中，随后经过深度过滤。

深度过滤器从免疫球蛋白过滤液中去除超过 4 个数量级的 PrP<sup>sc</sup>。PrP<sup>sc</sup> 的大部分可通过用高浓度 NaCl 溶液洗脱从免疫球蛋白过滤液中回收。有掺入的上清液 III 在深度过滤前的 0.22  $\mu\text{m}$  的预过滤去除了所有可检测的 PrP<sup>sc</sup>。小于 1 log 的 PrP<sup>sc</sup> 通过深度过滤从缓冲液对照中去除。参见实施例 6 和 7。

因此发现深度过滤从免疫球蛋白中去除 PrP<sup>sc</sup> 是通过机械过滤而不是通过吸附到过滤基质。免疫球蛋白制备物引起 PrP<sup>sc</sup> 从 <0.1  $\mu\text{m}$  的颗粒凝集为 >0.22  $\mu\text{m}$  的颗粒，可能是因为免疫球蛋白制备物中存在甲醇的缘故。深度过滤未能从缓冲液对照组样品中去除 PrP<sup>sc</sup>。

在此处实施例 3 中，在掺入 SBH 的上清液 III (“SupIII”) 深度过滤前进行超声波处理的 SBH 的膜过滤，以确保进行深度过滤的颗粒大小不大于 0.1 微米。这对深度过滤将提出最大的挑战且可以对 PrP<sup>sc</sup> 的去除机制进行表征。SBH 首先经超声波处理打碎 PrP<sup>sc</sup> 凝集物而促进膜过滤。尽管有超声波处理，还是有必要系列通过渐小的过滤器 (0.45 和 0.22 微米) 过滤 SBH 而将 0.1 微米滤器的堵塞减到最小。

Cuno Zeta Plus 90SP 深度过滤器利用两种机制去除颗粒。超过约 0.1 微米额定孔径的颗粒通过机械过滤大都滞留。小于 0.1 微米的，带负电荷的颗粒通过电动吸附至带正电荷的过滤基质 (美国专利 No. 4,859,340) 而滞留。因大于 0.1 微米的颗粒已在加入到上清液 III 和随后的深度过滤前从 SBH 中去除，这表明通过深度过滤的 PrP<sup>sc</sup> 的滞留是由于暴露于甲醇而引起的颗粒大小的增加。然而，去除朊病毒的电荷捕获机制在非处于其等电点的朊病毒被捕获时是有效的。

在掺入 SBH 的 SupIII 过滤后以及用 1.0M 和 2.0 M NaCl 溶液洗脱前的深度过滤器的检查显示少量物质存在于深度过滤器表面。其被认为是当 SBH 加入 SupIII 时形成的沉淀物，由 SupIII 中存在的甲醇引

起。为确定沉淀物是否包含 PrP<sup>sc</sup>，执行第二组操作，其中 SBH 掺入的 SupIII 在深度过滤前首先通过 0.22 微米滤器的预过滤。预过滤去除 PrP<sup>sc</sup> 至不可检测的水平，表明在前组中 PrP<sup>sc</sup> 是通过沉淀和机械过滤去除的，而不是通过静电吸附到深度过滤器上。Prusiner 等. (Biochemistry 1980; 19: 4883-91) 表明乙醇容易沉淀 PrP<sup>sc</sup>，所以分馏方法中使用的甲醇的存在具有同样的效果是不令人奇怪的。

为确定在沉淀醇缺乏时深度过滤是否去除了 PrP<sup>sc</sup>，设计对照（参见实施例 4），其中 PrP<sup>sc</sup> 掺入到水样缓冲液且随后被深度过滤。缓冲液对照中 PrP<sup>sc</sup> 去除的缺乏表明深度过滤没有通过机械过滤的方法（因为 PrP<sup>sc</sup> 之前已通过 0.1 微米滤器）或静电吸附保留蛋白。

这些研究表明深度过滤去除 PrP<sup>sc</sup> 有效性的先前报道可能是误导的。事实上，深度过滤确实去除 PrP<sup>sc</sup>，不是通过通常与深度过滤相关的吸附机制，而是通过沉淀蛋白质的机械过滤。本研究结果表明单独的深度过滤在去除 PrP<sup>sc</sup> 方面是无效的。然而，当与在前的沉淀步骤联合使用时，深度过滤或膜过滤对于从血浆分馏物中去除异常朊病毒蛋白是有效的机制。

任何合适的检测朊病毒的测定法都可用于本发明的定量方面。测定法中有 ELISA、SDS-Page、蛋白质印迹法、EG&G Wallac、DELFI A、Prionics 测定法、Enfer ELC ELISA、CEA ELISA、构象依赖的测定法、DELFI A 和毛细管电泳，上面只提到一部分，所有这些都是本领域技术人员熟知的。

在此发明人应用蛋白质印迹法来从已过滤和洗脱的生物液体样品中检测朊病毒。蛋白质印迹是一种用来鉴定和表征 PrP<sup>sc</sup> 的方法。PrP<sup>sc</sup> 通过提取而分离而且通过对蛋白酶 K 消化的部分抗性而区分。PrP<sup>BB5</sup>（抗蛋白酶消化的 PrP<sup>sc</sup>）通过糖基化形式及其片段的迁移位点而鉴定。该测定法的灵敏度低于传染性测定法灵敏度约 3 个数量级。灵敏度问题可通过离心制备物、去除上清和重悬朊病毒物质于较小体积、形成朊病毒物质的浓缩物而部分克服。然而，为替代旋转离心大体积生物液体例如体液，发明人已表明可通过用凝集作用辅助剂处理含有朊病毒的生物液体而捕获朊病毒，随后可通过过滤器过滤而浓缩，以及随后通过洗脱而收集于小体积。该技术可用于大规模的从产品流中去除朊病毒。

该方法将对免疫蛋白印迹法用于测定生物基质中 PrP<sup>sc</sup> 的存在产生主要的影响。本发明允许 TSE 材料得到快速定量浓缩以增强检测。当想要纯化生物或食品溶液的 PrP<sup>sc</sup> 时, 本发明在使生物或食品溶液和物质易于通过大额定孔径过滤器而过滤方面具有优势。

用于确定特异朊病毒捕获的标准蛋白质印迹测定法依赖于首先用蛋白酶 K 处理捕获的物质, 蛋白酶水消化所有正常朊病毒 (PrP<sup>c</sup>) 但不明显消化异常朊病毒 (PrP<sup>sc</sup> 或 PrP<sup>TSE</sup>)。消化依照 Lee 等., J Virol Methods 2000, 84: 77-89 的方法, 在 SDS 凝胶上以及转印迹到硝酸纤维素或 PVDF (聚偏乙烯氟化物) 膜进行。分离的 PrP<sup>TSE</sup> 条带用 3F4 或 6H4 显影。通常用 PBS 聚山梨酯 20-5% 脱脂奶粉缓冲液将 3F4 (贮液 1mg/ml) 稀释为 1:2000 或将 6H4 (贮液 2.5mg/ml) 稀释为 1:5000, 总体积 10mL。抗体用羊抗鼠 IgG-HRP 结合物 (同样的缓冲液中 1:50,000) 检测。条带用通常为化学发光的 HRP 底物检测, 且在暴露于 x-射线胶片后显影。参见上述 Lee 等。

特异的 PrP<sup>sc</sup> 单抗如 16A18 可在磁珠 (Dyna1 甲苯磺酰活化的, Dynal Biotech, Oslo, 挪威) 上特异性地结合 PrP<sup>sc</sup>, 该抗体可用于检测 PrP<sup>sc</sup> 的存在, 好于蛋白质印迹法。该家族大部分抗体能捕获 PrP<sup>sc</sup> 但是检测就依赖于上述蛋白质印迹方式中的 3F4 或 6H4。

其他检测 PrP<sup>sc</sup> 的方法包括 ELISA 和 SDS-Page 和上述公开的其他通常采取的检测方法。

在 PrP<sup>sc</sup> 物质在滤器例如灭菌滤器上捕获的情况下, 其中滤器例如用朊病毒特异的抗体特异性地结合朊病毒, 蛋白质印迹法就不需要用于检测 PrP<sup>sc</sup> 了。更好地, 朊病毒特异的抗体例如单克隆抗体可用于检测和定量朊病毒。这样的抗体包括普通的朊病毒抗体 6H4 或 3F4, 其识别正常 (PrP<sup>c</sup>) 和异常 (PrP<sup>sc</sup> 和 PrP<sup>TSE</sup>) 朊病毒。如果膜结合所有形式的朊病毒, PrP<sup>sc</sup> 的相对数量将很低 (例如约少于存在朊病毒的 1%)。异常朊病毒的特异单克隆抗体, 例如 16A18 或 12A5, 可用于在膜结合所有形式 (正常和异常) 朊病毒的情况下检测 PrP<sup>sc</sup>。如果信号可被放大, 使用所述单克隆抗体将有可能检测 PrP<sup>sc</sup>, 如果需要, 可使用化学发光底物或聚 HRP 结合物。

在此公开的本发明方法导致测定法的检测限提高超过 100 倍, 目前达到传染性测定法的检测限。用现有技术中已有的方法, 传染性测

定法依赖于所研究的种类需要数月才得到结果。本发明人还表明测定法可通过不需要洗脱而检测膜上异常朊病毒的存在来简化。

在免疫球蛋白中 PrP<sup>sc</sup> 凝集和去除的本发明方法的使用中, 以及尤其在抗-D 免疫球蛋白, 特别是 RhoGAM Rho(D) 免疫球蛋白(人)的制备中, 参考图 1 的流程图和 Cohn 等, J. Am. Chem. Soc., Vol. 68, pages 459-475 的方法, 分馏从人全血浆进行。血浆冷却至约 1℃ 然后从上清液中离心分离冷的未溶解的沉淀物。上清液进一步分馏产生沉淀物 I 和上清液 I。弃去主要由纤维蛋白原组成的沉淀物 I。上清液 I 进一步分馏产生上清液 II+III 和沉淀物 II+III。上清液 II+III (被弃去) 含有  $\alpha$  和  $\beta$  球蛋白和脂类。沉淀物 II+III 主要由  $\beta$  和  $\gamma$  球蛋白和同种凝集素组成, 但也包含凝血酶原、纤连蛋白原、胆固醇和其他脂类。沉淀物 II+III, 经进一步分馏产生上清液 II+III W 和沉淀物 II+III W。  $\beta$  球蛋白、胆固醇和其他脂类在弃去的上清液 II+III W 中被大量去除。沉淀物 II+III W 主要由  $\gamma$  球蛋白、同种凝集素、纤连蛋白原和凝血酶原以及一些  $\beta$  球蛋白、胆固醇和其他脂类组成。经进一步分馏, 沉淀物 II+III W 产生上清液 III+沉淀物 III。沉淀物 III (被弃去) 含有同种凝集素、纤连蛋白原和凝血酶原。上清液 III 主要由  $\gamma$  球蛋白和少量纤维蛋白原和脂类组成。分馏的最后一个步骤产生沉淀物 II, 其为基本纯净的  $\gamma$  G 球蛋白。由本发明方法制备的沉淀物 II 为抗 Rh  $\gamma$  球蛋白。

在本发明优选方法中, 用于重悬的免疫球蛋白起始材料为从改进的 Cohn 方法得来的沉淀物 II 糊状物。若蛋白在赋形剂存在下冻干, 则冻干的沉淀物 II 糊状物也可使用, 赋形剂为如美国专利 No. 6, 096, 872 所涉及的那些。在这种情形下本发明捕获朊病毒的过滤步骤优选在沉淀物 II 的分馏中进行; 参考上面所述以及图 1, 导致朊病毒捕获的免疫球蛋白的分馏在沉淀物 II 获得前、获得上清液 III 后, 或最优选在上清液 III 和已过滤的上清液 III 之间进行, 如所示。所述用凝集作用辅助剂甲醇处理材料, 以及以约 4: 1 的 MeOH: 上清液 III 比率, 在上清液 III 中凝集朊病毒, 其凝集物随后可用本发明进一步的方法去除。本发明的捕获朊病毒的过滤步骤也可在制成的免疫球蛋白制品中进行。然而, 用凝集作用辅助剂处理和过滤也可作为制品处理的最后阶段进行, 只要该阶段的处理和过滤没有影响生物学活性

或另外损害终产物。

本发明制备物的施用模式将确定生物体中化合物递送的部位和/或细胞。通过本发明方法纯化的化合物能单独施用但通常与药用载体或稀释剂一起以混合物形式施用，载体或稀释剂按照施用的预期途径和标准的药学实践选择。制备物可经胃肠外注射，例如，动脉内或静脉内注射。制备物也可通过口服、皮下或肌肉途径递送。对于胃肠外施用，它们可以以，例如，灭菌的、水溶液形式使用，其可含有其他溶剂，例如，足够的盐或葡萄糖以使溶液等渗。

对于口服施用，本发明纯化的组合物能以片剂、胶囊、锭剂、粉剂、糖浆剂、酏剂、水溶液和悬浮液等等形式使用。在片剂情形中，可用的载体包括乳糖、柠檬酸钠和磷酸盐。各种崩解剂如淀粉，和润滑剂如硬脂酸镁通常在片剂中使用。对于胶囊形式的施用，有用的稀释剂为乳糖和高分子量聚乙二醇。当水溶液需要口服使用时，可加入一些甜味料和/或调味剂。

本发明基本上纯化的制备物可施用于受试者如哺乳动物，包括人。对于疾患处理中的施用，处方医师或兽医将最终确定所给人或动物受试者的合适剂量，且这可根据体重、年龄和个体的应答以及个体症状的性状或严重性而不同。

在本发明基本上纯化的抗-D 免疫球蛋白的情形下，每剂剂量可在约 300  $\mu$ g RhoGAM®和约 50  $\mu$ g MICRhoGAM®的范围，每种都按照指导和上述讨论的目的以及各自的产品说明书施用。上述提及的每种制品也可以是多剂量的，总体施用由治疗医师确定。

本发明无朊病毒的制备物可包括生物物质、药剂、食品和饲料，且本发明的方法可在同样的处理过程中使用。

各种专利和文献作为参考贯穿本发明始终。此处将其内容完整引入本发明作为参考，以使得更充分地描述本领域普通技术人员已知的技术状态和本发明所要求保护的内容。

下列实施例的提供仅是为了说明的目的，而不能视作对本发明范围的限制。

### 实施例

#### 实施例 1 - 用凝集作用辅助剂的 Rho (D) 免疫球蛋白沉淀物 II 的生产

该实施例描述了对人血浆分馏的方法以获得在 Rho (D) 免疫球蛋白生产中使用的沉淀物 II。

血浆单元 (抗-D) (总共约 943L) 在 2℃ 至 8℃ 贮藏 4 天以融解。在不锈钢水套罐中混合收集, 5℃-10℃ 水循环通过。的血浆在 1℃-3℃ 搅拌 30 分钟。血浆加入以 1000mL/min 的速率连续流动的离心机中离心。冷的未溶解上清液 (离心的血浆) 收集在不锈钢套罐中且搅拌至获得均一的混合物。此时的批样体积为 905L 的上清液 (澄清的血浆)。

整批样上清液的 pH 用 2.172 L 5.0N NaOH 调至 pH9.45。甲醇 (71%), 160.185 L 在 -5.3℃ 加入 pH 已调节的批样中。pH 为 9.37。该批样可在 -5.2℃ 存放 13.5 小时。终体积为 1067.357L。

该批样在 -5.8℃ 加入以 1000mL/min 的速率连续流动的离心机中离心。上清液 I 收集在不锈钢套管罐中, 充分混合。沉淀物 I 作为医疗废弃物弃去。上清液 I 通过加入 3.132L, pH4.0 的浓缩醋酸钠缓冲液和 627.444 L 71% 的甲醇调节 pH。该批样的温度为 -5.5℃, pH6.75。该批样可存放 14 小时。

该批样在 -5.5℃ 加入以 1000mL/min 的速率连续流动的离心机中离心。沉淀物 II+III 转移到不锈钢罐中; 收集到 40.220 KG 净重; 净重沉淀物 II+III 在 +1.1℃ 下重悬入两倍体积 (L) 注射用水, U.S.P. (80.440L) 中, 且搅拌 45 分钟至获得均一的悬浮液。加入三倍体积 (120.660 L) 0.0187M 磷酸氢二钠且在 2.1℃ 下搅拌 30 分钟。

在不锈钢套罐中, 19 倍体积 (764.180L) 注射用水, U.S.P. 冷却至 1.0℃。使用大容量转移泵, 该批样与 19 倍体积注射用水, U.S.P. 缓慢混合, 且搅拌 30 分钟。

71% 甲醇的体积调节至等于 15 倍沉淀物 II+III 的重量。甲醇 (603.300L) 冷却至 -14℃, 且用不锈钢 Sparger 设备和计数泵将甲醇加入批样中同时逐渐降低温度至 -5.5℃。在甲醇加入完全后将批样搅拌 1 小时。pH 为 7.23。批样可存放 10 小时 20 分钟。

通过在 -5.8℃ 以 500mL/min 的速率连续流动的离心机中离心批样而形成沉淀物 III。沉淀物 II+IIIw 从盘中转移入不锈钢罐; 净重为 22.760 kg。

沉淀物 II+IIIw 在 +1.3℃ 下重悬入两倍体积 (L) (45.520L) 注

射用水, U.S.P. 中, 且搅拌 45 分钟至获得均一的悬浮液。加入两倍体积 (45.520 L) 0.175M 醋酸钠且在 1.4℃ 下搅拌 30 分钟。全部批样的 pH 通过加入 0.489L pH4.0 的醋酸钠缓冲液于 22.760L 注射用水, U.S.P. 中 (总体积 137.049L), 再将两者加入到批样中调节, 且在 1.5℃ 搅拌 1 小时。pH 为 5.38。在不锈钢套罐中, 将 13.5 倍体积 (307.260L) 注射用水, U.S.P. 搅拌冷却至 2.5℃。使用高容量转移泵, 将该批样与该注射用水混合, 总计算体积为 444.309L。NaCl (6.168L, 1.33M) 加入 22.760 Kg 沉淀物 II+III 中, 搅拌 30 分钟。

71% 甲醇的体积调节至等于 8.78 倍沉淀物 II+III 的重量。甲醇 (199.833L) 冷却至 -10.5℃, 且甲醇用不锈钢 Sparger 设备和计数泵加入批样中同时逐渐降低温度至 -6.6℃。在甲醇加入完全后批样搅拌 1 小时。pH 为 5.38。批样可在 -6.3℃ 存放 8 小时 30 分钟。

沉淀物 III 的形成如下进行: 该批样在 -6.3℃ 以 500mL/min 的速率连续流动的离心机中离心。上清液 III 收集在不锈钢罐中。沉淀物 III 作为血废弃物弃去。

上清液 III 的过滤如下进行:

CUNO 滤器 90SP 套包括 (4) 16 sq. ft. 筒, 按照制造商的说明装配。醋酸钠-甲醇缓冲液 (320L) 冷却至 -6.5℃, 且通过滤器筒过滤 55 分钟。醋酸钠-甲醇缓冲液洗涤溶液在开始前从滤器筒中完全吹出。该批样用 Cuno 滤器 90SP 按照良好的制造实践和使用制造商的说明书过滤。当全部体积的上清液 III 过滤时, 滤器筒中的压力释放。过滤的上清液 III 的体积为 622L, 且在中等速度搅拌。NaCl (1.33M, 23.387 mL) 缓慢加入上清液 III, 在 6.5℃ 搅拌 30 分钟。pH 为 5.38, 用 4.840L 1.0M 碳酸氢钠调节至 7.10 且混合 30 分钟。等于 0.166 倍上清液 III 体积 (103.252 L) 的甲醇 (100%) 用 Sparger 设备和计数泵加入到上清液 III 中且强力搅拌。PH 为 7.3。

沉淀物 II 的分馏如下进行: 该批样在 -6.3℃ 以 500mL/min 的速率连续流动的离心机中离心且弃去上清液。干氮用于切断供给线且干燥旋转 15 分钟。沉淀物 II (7,420 g) 从离心盘转入焦油化的不锈钢罐中, 在 -22.1℃ 下贮存。该物质在病毒清除过程中按照共同转让给 Van Holten 等的在 2000.8.1 公布的美国专利 No. 6,096,872 的方法使用。

### 实施例 2 - 从实施例 1 来的朊病毒的洗脱和检测

用于过滤通过上述实施例 1 的方法获得的上清液 III 的 Cuno 深度过滤器上收集的朊病毒用下面实施例 3 的方法洗脱、定量和检测。

尤其是, 实施例 1 中使用的 Cuno 深度过滤垫从滤器套中去除且置于含有 45ml 1.0M NaCl (洗脱缓冲液) 的培养皿中。培养皿置于旋转振荡器上且轻轻涡动约 20-30 分钟。去除滤器且用 45ml 2.0M NaCl (洗脱缓冲液) 第二次洗涤 20-30 分钟。

对洗脱物 PrP<sup>sc</sup> 的蛋白质印迹分析用源于 1.0M NaCl 洗脱缓冲液的洗脱物进行, 且用源于 2.0M NaCl 洗脱缓冲液的洗脱物单独进行第二个蛋白质印迹分析, 均按照实施例 3 的蛋白质印迹方法进行。

### 实施例 3 - 免疫球蛋白制备物中 PrP<sup>sc</sup> 的去除和定量

含有抗-D 的上清液 III (SupIII) (190mL) 从全部的 (约 450 升) 修饰的 Cohn-Oncley 分馏物 (Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan N.J) 中获得 (参见上述实施例 1)。SupIII 在 -70℃ 贮存而在加入瘙痒病脑组织匀浆前于 25℃ 融解, 然后在 -5.5℃--7.5℃ 平衡。

#### 脑组织匀浆

瘙痒病脑组织匀浆 (10%) 用 263K 仓鼠适合制剂感染的仓鼠脑制备。冷冻的脑 (约 3-20, 每脑 0.5 克) 在冰上融解, 然后在 9 倍体积 pH8.0 的 Tris 缓冲盐溶液中匀浆。匀浆通过在 2-8℃ 1200 r.c.f. 下离心 20 分钟澄清。百分之一 (1%) 的溶血卵磷脂加入上清液中至终浓度 0.1% (w/v)。该物质贮存于 -70℃ 备用。使用前, SBH 在室温水浴融解, 然后用角质杯进行超声波处理 (Misonix Sonicator XL2020) (Heat Systems, Farmingdale, N.Y.) 约每毫升 2 分钟直至溶液由浑浊变为半透明。处理的匀浆随后系列通过 Millex® 25 mm PVDF 注射器驱动的过滤单元, (Millipore 公司) 0.45/0.22/0.1 微米过滤器连续过滤, 其进一步使物质澄清。从 Cohn 分馏过程来的上清液 III (SupIII) (200 mL) 中掺入已过滤的 SBH (1:51 稀释)。第二组在深度过滤开始前经过 0.22 微米滤器的过滤以去除任何可能在混合物中形成的凝集物 (参见实施例 5)。SHB 样品在处理前和超声波处理及过

滤后抽样用于蛋白质印迹评估。

### 过滤

47 mm CUNO Zeta Plus 90SP 滤垫 (Cuno 公司, Meridan Conn.) 置于其不锈钢过滤套中。蠕动移液泵用于控制过滤的流量至约 1 ml/min 的速率。整个滤器套置于隔离的氯化钠冰浴中冷却滤器至约 -5.5℃ 至 -7.5℃。醋酸钠-甲醇缓冲液 (80ml 0.01N 醋酸钠甲醇缓冲液, 22.7% MeOH) 在 -5.5℃ 至 -7.5℃ 用于洗涤滤器。SBH 掺入的 SupIII (180 ml) 在 -5.5℃ 至 -7.5℃ 以 1.0 ml/min 的流速经过 CUNO 滤器过滤。在过滤起始 (75ml)、中间 (75ml) 和结束 (30ml) 等分收集滤液。在整个过滤时系统压力得到监控且为约 2psi。

### 从滤器洗脱 PrP<sup>sc</sup>

过滤后, 滤垫从滤器套去除, 粗面向上, 置于烧杯中且用 45 mL 1.0M NaCl 洗脱缓冲液通过在旋转振荡器上轻轻的涡动而洗涤 20-30 分钟。去除滤器且用 45ml 2.0M NaCl 通过在旋转振荡器上轻轻的涡动而第二次洗涤 20-30 分钟。通过在 4℃ 下, 100,000 × g 离心约 1 小时进一步浓缩 PrP<sup>sc</sup> 是可能的, 然而这不是必要的, 因其已得到足够的浓缩可用于蛋白质印迹分析, 如表 1 所示。

除了掺入 SBH 的 SupIII 首先经过了 Millex0.22 微米滤器预过滤之外, 第二组与第一组完全相同。

执行对照组, 冷却过滤装置至 0℃ 且用 80mL TBS 洗涤深度滤垫。用已过滤的 SBH (1:51 稀释) 掺入的 TBS (180mL) 在与前述相同的流速下过滤, 随后滤器被洗涤。参见实施例 4。

对洗脱物 PrP<sup>sc</sup> 的蛋白质印迹分析用源于 1.0M NaCl 洗脱缓冲液的洗脱物进行, 且用源于 2.0M NaCl 洗脱缓冲液的洗脱物单独进行第二个蛋白质印迹分析, 均按照下述蛋白质印迹方法进行。

参见表 1, 数据显示, 其中两次洗脱后 PrP<sup>sc</sup> 显示已从滤器上洗脱。

### 蛋白质印迹

#### 样品制备

样品制备和测定方法按照 Lee 等., J Virol Methods 2000;

84:77-89 进行。样品用蛋白酶 K 消化步骤处理,其用于区分 PrP<sup>sc</sup> 和 PrP<sup>c</sup>。蛋白酶 K 处理后,样品在 4℃ 20,000 r.c.f. 下离心 1 小时。沉淀物重悬于 10 μl 每份 2 × 十二烷基硫酸钠 (SDS) 样品缓冲液中且在 100℃ 加热 5 分钟。在加入到凝胶用蛋白质印迹法检测 PrP<sup>sc</sup> 前制备半-对数连续稀释液,所有的按照 Lee 等。(上述)

## 测定

按照上述 Lee 等的方法测定样品。每个样品在 12% SDS-Tris-甘氨酸聚丙烯酰胺凝胶上以 125 伏恒定电压电泳 60 分钟。凝胶在 125mA 恒定电流下向硝酸纤维素膜转移 60 分钟,随后浸于 TBS 及在 5% 脱脂奶粉中封闭 60 分钟。转移和封闭后,膜在 3F4 单抗中孵育。洗涤后,膜暴露于碱性磷酸酶偶联的抗-鼠 IgG 二抗中。印迹随后浸于 CDP-Star plus NitroBlock II 中,然后曝光在 Kodak XAR-2 胶片上。有效的测试通过在 33 kDa 分子标记处显示条带的阳性对照确定。一般,两条小于 33 kDa 的稍弱的条带也可观察到。三条带一般为 PrP<sup>RBS</sup> 的蛋白质印迹图像(上述, Lee 等)。

## 结果

超声波处理和依次的膜过滤从 SBH 中去除了所有的浑浊物。随后掺入 SBH 的免疫球蛋白制备物的深度过滤降低了滤液中 PrP<sup>sc</sup> 的浓度至低于蛋白质印迹测定法的检测限(表 1)。大量 PrP<sup>sc</sup> 通过用高盐溶液洗脱从滤垫回收。深度过滤前掺入 SBH 的 SupIII 经过 0.22 微米滤器的过滤去除 PrP<sup>sc</sup> 至不可检测的水平。掺入 SBH 的缓冲液对照的深度过滤很少或没有去除 PrP<sup>sc</sup>。

此处实施例 3 中,超声波处理的 SBH 的膜过滤在 SBH 掺入的 SupIII 的深度过滤前进行以确保深度过滤看到的颗粒大小不大于 0.1 微米。这对深度过滤将提出最大的挑战且允许对 PrP<sup>sc</sup> 的去除机制进行表征。SBH 首先经超声波处理打碎 PrP<sup>sc</sup> 凝集物而促进膜过滤。尽管有超声波处理,还是有必要通过一系列逐渐变小的过滤器(0.45 和 0.22 微米)连续过滤 SBH 而将 0.1 微米滤器的堵塞减到最小。

在掺入 SBH 的 SupIII 过滤后以及用 1.0M 和 2.0M NaCl 溶液洗脱前的深度过滤器的检查显示少量物质存在于深度过滤器表面。其被认

为是当 SBH 加入 SupIII 时形成的沉淀物, 由 SupIII 中存在的甲醇引起。为确定沉淀物是否包含 PrP<sup>sc</sup>, 执行第二组, 其中 SBH 掺入的 SupIII 在深度过滤前首先通过 0.22 微米滤器的预过滤。参见实施例 6。预过滤去除 PrP<sup>sc</sup> 至不可检测的水平, 表明在前组中 PrP<sup>sc</sup> 是通过沉淀和机械过滤去除的, 而不是通过吸附到深度过滤器上。

**表 1**

通过蛋白质印迹测定法测定掺入瘙痒病脑组织匀浆 (SBH) 的免疫球蛋白制备物中的 PrP<sup>sc</sup>

| 样品名称 | 总 Log <sub>10</sub><br>(朊病毒单位) | 剩余物质 | Log <sub>10</sub><br>降低系数* |
|------|--------------------------------|------|----------------------------|
|------|--------------------------------|------|----------------------------|

SBH 掺入的 SupIII 的深度过滤

|          |      |      |      |
|----------|------|------|------|
| 掺入加样     | 6.9  | 100% | >5.2 |
| 早期滤液     | <2.7 | 0%   |      |
| 中期滤液     | <2.1 | 0%   |      |
| 晚期滤液     | <2.1 | 0%   |      |
| 盐洗脱 (1M) | 5.2  | 32%  |      |
| 盐洗脱 (2M) | 5.0  | 1%   |      |

SBH 掺入的 SupIII 经 0.22 μm 过滤后的深度过滤

|                |      |      |      |
|----------------|------|------|------|
| 掺入加样           | 7.1  | 100% | >3.0 |
| 掺入加样 II        | <4.1 | 0%   |      |
| (0.22 μm 过滤的)† |      | 0%   |      |
| 早期滤液           | <2.7 | 0%   |      |
| 中期滤液           | <2.1 | 0%   |      |
| 晚期滤液           | <2.0 | 0%   |      |
| 盐洗脱 (1M)       | 3.2  | 0%   |      |
| 盐洗脱 (2M)       | <3.5 | 0%   |      |

SBH 掺入的 TBS 的深度过滤

|          |     |      |     |
|----------|-----|------|-----|
| 掺入加样     | 7.0 | 100% | 0.8 |
| 早期滤液     | 6.2 | 16%  |     |
| 中期滤液     | 6.7 | 50%  |     |
| 晚期滤液     | 6.0 | 11%  |     |
| 盐洗脱 (1M) | 4.5 | 0.3% |     |
| 盐洗脱 (2M) | 4.5 | 0.3% |     |

\* Log<sub>10</sub> 降低系数为相对于过滤中在掺入量 II 中 PrP<sup>RES</sup> 的区别。

† 掺入加样 II 为 SBH 掺入的免疫球蛋白 (即. 掺入加样 I), 其经过 0.22 μm 过滤以去除任何潜在的通过加入 SBH 至 IgG 形成的凝集物。

“<” 表明最大值; 在任何滤液样品中无 PrP<sup>RES</sup> 被检测到。

#### 实施例 4 - 对照

为确定在沉淀物醇缺乏时深度过滤是否去除了 PrP<sup>sc</sup>，执行一对照组，其中 PrP<sup>sc</sup> 掺入到水样缓冲液且随后被深度过滤。

实施例 3 的材料和方法重复进行，其中同浓度和体积 (3.6ml) 的 SBH 掺入到 180ml 0.1M Tris 缓冲盐溶液 (TBS) 中。缓冲液对照中 PrP<sup>sc</sup> 去除的缺乏表明深度过滤没有通过机械过滤的方式 (因为 PrP<sup>sc</sup> 之前已通过 0.1 微米滤器) 或静电吸附保留蛋白。参见表 1。

这些数据表明深度过滤去除 PrP<sup>sc</sup> 有效性的先前报道可能是误导的。事实上，深度过滤确实去除 PrP<sup>sc</sup>，但不是通过通常与深度过滤相关的吸附机制，而是通过沉淀蛋白质的机械过滤。这些研究结果表明单独的深度过滤在去除 PrP<sup>sc</sup> 方面是无效的。然而，当与在前的沉淀步骤联合使用时，深度过滤或膜过滤对于从血浆分馏物中去除异常朊病毒蛋白是有效的机制。

#### 实施例 5 - 从滤器洗脱 PrP<sup>sc</sup>

实施例 3 中使用的滤垫从滤器套中去除且置于带有 45ml 1.0M NaCl (洗脱缓冲液) 的培养皿中。培养皿置于旋转振荡器上且轻轻涡动约 20-30 分钟。去除滤器且用 45ml 2.0M NaCl (洗脱缓冲液) 第二次洗涤 20-30 分钟。

对洗脱物 PrP<sup>sc</sup> 的蛋白质印迹分析用源于 1.0M NaCl 洗脱缓冲液的洗脱物进行，且用源于 2.0M NaCl 洗脱缓冲液的洗脱物单独进行第二个蛋白质印迹分析，均按照实施例 3 的蛋白质印迹方法进行。参见表 1，数据显示，其中两次洗脱后 PrP<sup>sc</sup> 显示已从滤器上洗脱。

#### 实施例 6 - SBH 在 0.22 微米滤器中的预过滤

为确定实施例 3 的深度过滤步骤前滤器上观察到的沉淀物是否包含 PrP<sup>sc</sup>，执行第二组，其中 SBH 掺入的 SupIII 在深度过滤前首先通过 0.22 微米滤器的预过滤。实施例 3 的材料和方法重复进行，其中 SBH 掺入的 SupIII 在深度过滤前经过 0.22 微米滤器的预过滤。参见表 1，表明预过滤去除 PrP<sup>sc</sup> 至不可检测的水平，表明在前组中 PrP<sup>sc</sup> 是通过沉淀和机械过滤去除的，而不是通过静电吸附到深度滤器上。

### 实施例 7 - PrP<sup>sc</sup>从滤器的洗脱

实施例 6 中使用的滤垫从滤器套中去除且置于带有 45ml 1.0M NaCl (洗脱缓冲液) 的培养皿中。培养皿置于旋转振荡器上且轻轻涡动约 20-30 分钟。去除滤器且用 45ml 2.0M NaCl (洗脱缓冲液) 第二次洗涤 20-30 分钟。

对洗脱物 PrP<sup>sc</sup> 的蛋白质印迹分析用源于 1.0M NaCl 洗脱缓冲液的洗脱物进行, 且用源于 2.0M NaCl 洗脱缓冲液的洗脱物单独进行第二个蛋白质印迹分析, 均按照实施例 3 的蛋白质印迹方法进行。

参见表 1, 数据显示, 其中两次洗脱后 PrP<sup>sc</sup> 显示已从滤器上洗脱。

### 实施例 8 - 朊病毒从血样品的清除

牛全血 (250ml) 在 100 × g 离心以去除红细胞。得到的血浆与 75ml 22.7% 的甲醇混合以凝集朊病毒物质。混合物在旋转混合器上轻轻涡动 5 分钟。混物流经由上述实施例 3 准备的 47 mm Cuno Zeta Plus 90S 滤器。随后该物质通过在 5 ml 1.0 M NaCl-15 mg/mL 甘氨酸溶液中洗涤滤垫而洗脱用于蛋白质印迹分析。随着按照 Lee 等的提取和浓缩, 0.5ml 该物质通过按照实施例 3 方法的蛋白质印迹法得到分析。

上述方法导致测定法的检测限提高超过 100 倍, 目前达到传染性测定法的检测限。用现有技术中已有的方法, 传染性测定法需要数月才得到结果, 其依赖于所研究的种类。本发明人还表明测定法可通过不需要 G17 洗脱而检测膜上异常朊病毒的存在来简化。

### 实施例 9 - 朊病毒从尿样品的清除

人尿样品 (200ml) 在 3000rpm 沉淀 5 分钟以弃去偶尔的细胞碎片。尿样与 75ml 22.7% 的甲醇混合以凝集朊病毒物质。混合物在旋转混合器上轻轻涡动 5 分钟。混物流经由上述实施例 3 准备的 47 mm Cuno Zeta Plus 90S 滤器。随后该物质通过在 5 ml 1.0 M NaCl-15 mg/mL 甘氨酸溶液中洗涤滤垫而洗脱用于蛋白质印迹分析。随着按照 Lee 等的提取和浓缩, 0.5ml 该物质通过按照实施例 3 方法的蛋白质印迹法得到分析。

本领域技术人员可以理解前面的描述和实施例对实现本发明是例

---

证性的，绝非限制性的。在不违背本发明范围和精神下可以作出对此处所呈现细节的变动。

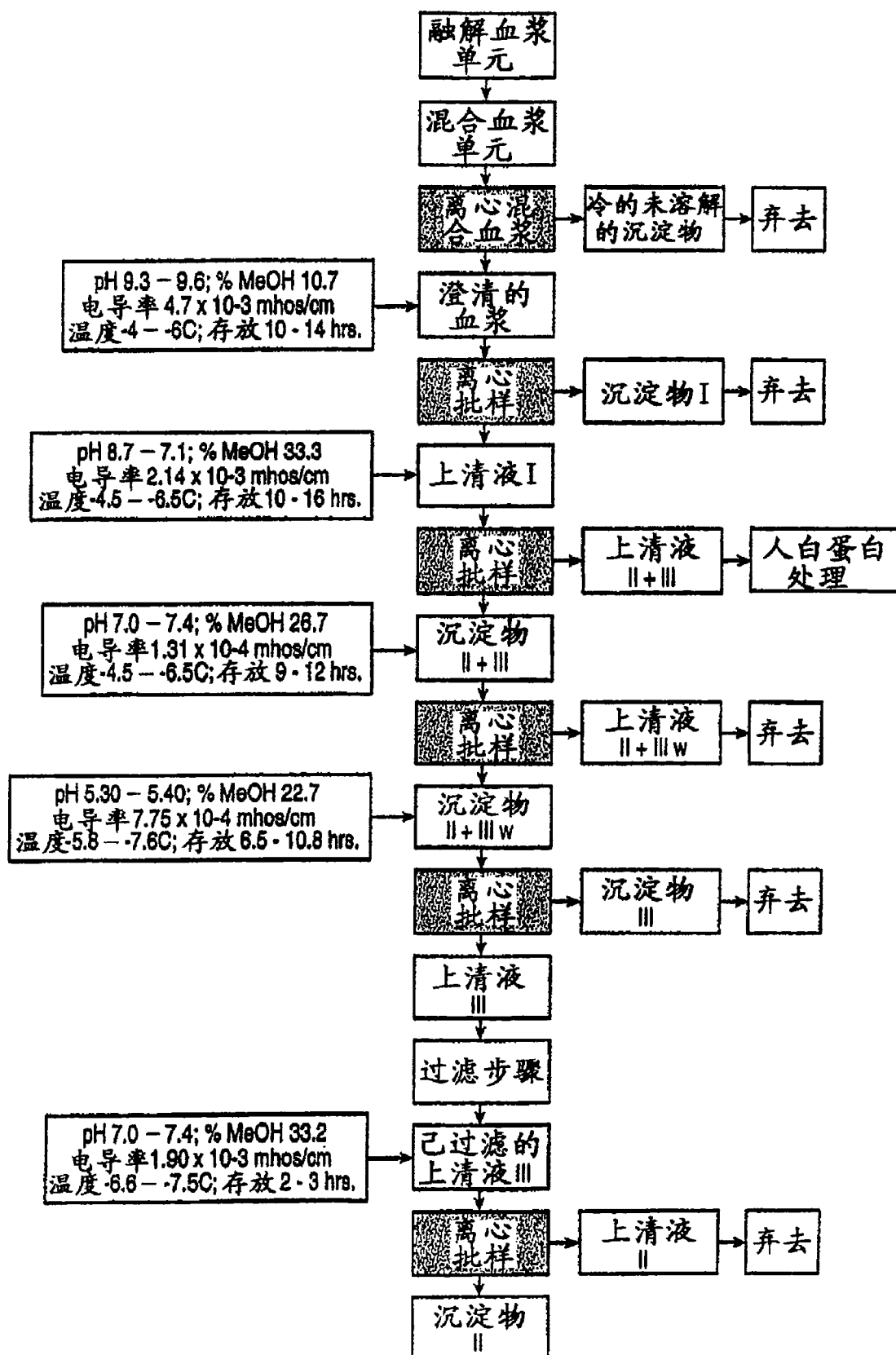


图 1