

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-531604

(P2004-531604A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 1 D 7/42	C 1 1 D 7/42	4 H 0 0 3
C 1 1 D 3/386	C 1 1 D 3/386	
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 69 頁)

(21) 出願番号	特願2002-580887 (P2002-580887)	(71) 出願人	503373997
(86) (22) 出願日	平成14年3月22日 (2002. 3. 22)		バイオリソース インターショナル, イン
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月10日 (2003. 10. 10)		コーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/008982		アメリカ合衆国, ノースカロライナ州 2
(87) 国際公開番号	W02002/083082		7606, ラレイ, スイート 3560,
(87) 国際公開日	平成14年10月24日 (2002. 10. 24)		メイン キャンパス ドライブ 840
(31) 優先権主張番号	09/834, 284	(74) 代理人	100079108
(32) 優先日	平成13年4月12日 (2001. 4. 12)		弁理士 稲葉 良幸
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100080953
(31) 優先権主張番号	10/007, 613		弁理士 田中 克郎
(32) 優先日	平成13年10月26日 (2001. 10. 26)	(74) 代理人	100093861
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 大賀 眞司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 感染性プリオン蛋白を破壊するための組成物および方法

(57) 【要約】

プリオン破壊プロテアーゼを用いた感染性プリオン蛋白の熱/酵素処理による、伝染性海綿状脳症 (TSE) および/または他のプリオン蛋白媒介疾患を伴う感染性プリオン蛋白を破壊する方法および組成物。前記方法および組成物は、感染性プリオン蛋白株を含有するか、または感染性プリオン蛋白株によって汚染された組織の処理、あるいは手術器具、台所用品、実験器具などのプリオン汚染物品の消毒または殺菌に適用できる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

感染性プリオン蛋白で汚染または汚染の疑いがある位置における感染性プリオン蛋白を減少させるための処理方法であって：

( a ) 前記位置における感染性プリオン蛋白の蛋白分解の感受性を高める十分な温度で、かつ十分な時間、前記位置を加熱するステップと；

( b ) かかる位置における感染性蛋白プリオンの少なくとも部分的減少に効果的である蛋白分解酵素に前記加熱位置を曝露させるステップと、を含む方法。

## 【請求項 2】

ステップ ( a ) における温度が、約 1 5 0 を超えない温度を含む、請求項 1 に記載の方法。 10

## 【請求項 3】

ステップ ( a ) における温度が、約 1 0 0 から約 1 5 0 の範囲の温度を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

ステップ ( a ) における温度が、約 1 2 5 から約 1 4 0 の範囲の温度を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

ステップ ( b ) が、約 3 5 から約 1 0 0 の範囲の温度で行われる、請求項 1 に記載の方法。 20

## 【請求項 6】

ステップ ( b ) が、約 4 0 を超える温度で行われる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

ステップ ( b ) が、約 5 0 を超える温度で行われる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

ステップ ( b ) がス、テップ ( a ) の温度よりも低い温度で実施される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

ステップ ( b ) が、約 4 0 から約 7 5 の範囲の温度で行われる、請求項 1 に記載の方法。 30

## 【請求項 1 0】

ステップ ( b ) が、約 5 0 から約 6 0 の範囲の温度で行われる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 1】

前記蛋白分解酵素が、ケラチナーゼ酵素類、プロティナーゼ K、キモトリプシン類、ペプシン類、キモシン類、カテプシン類、スブチリシン類、エラスターゼ類、コラゲナーゼ類、エンドペプチダーゼ類、ペプチダーゼ類、オリゴペプチダーゼ類、サーモリシン類、バシロリシン ( b a c i l l o l y s i n )、ミシリシン類 ( m y c i l y s i n s )、カルボキシペプチダーゼ類、ロイシルアミノペプチダーゼ類、アミノペプチダーゼ類、高好熱性プロテアーゼ類、カルボニルヒドロラーゼ、パパイン、パンクレアチン、ストレプトキナーゼ、ストレプトドルナーゼ、フィシン、カルボキシペプチダーゼ、キモパパインおよびプロメリンからなる群から選択される酵素を含む、請求項 1 に記載の方法。 40

## 【請求項 1 2】

前記蛋白分解酵素が、角質分解酵素および / またはその活性フラグメントを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

前記蛋白分解酵素が、パチルス - リケニフォルミス P W D - 1 酵素および / またはその活性フラグメントを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

さらに前記位置内の感染性プリオン蛋白の減少を確認するために前記位置を試験するステ 50

ップ（C）を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記試験ステップ（C）が、前記位置をウェスタンブロット試験、サンドイッチ免疫学的検定試験、ELISA 試験、蛍光免疫学的検定試験、毛管免疫電気泳動試験、およびプラスミノゲン結合試験からなる群から選択された試験に供することを、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記試験ステップ（C）が、前記位置を前記ウェスタンブロット試験に供することを、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記位置が感染性プリオン蛋白を含有するか、または前記位置内の感染性プリオンにより汚染された組織を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記組織が哺乳動物の組織を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記組織が神経系組織を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記組織がウシ組織を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

前記組織が BSE 感染組織を含む、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記組織がヒツジ組織を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 23】

前記組織がスクラピー感染組織を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 24】

前記組織が、脳組織、下垂体組織、腸組織、肺組織、心組織、腎組織および脾組織からなる群から選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 25】

前記組織が感染性プリオン蛋白のキャリア動物由来である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 26】

前記位置が、感染性プリオン蛋白による汚染を受けやすい物品を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記物品が手術器具を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記手術器具が、クランプ類、鉗子類、はさみ類、ナイフ類、ケーブル類、パンチ類、ピンセット類、カニューレ類、キャリア類、カーバー類、キュレット類、スクレーパー類、拡張器類、クリップアプリケーション類、開創器類、コントラクタ類、エキスカベータ類、持針器類、吸引管類、凝固電極類、脳波計深部電極類、肋骨並びに胸骨スプレッダー類、双極性プローブ類、および肋骨用鋏類からなる群から選択される、請求項 27 に記載の方法

40

【請求項 29】

前記物品が食卓用金物類および台所用品を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

前記食卓用金物類および台所用品が、ナイフ類、フォーク類、はさみ類、ピラー類、皮むき器類、スライサー類、へら類、および包丁類からなる群から選択される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記物品が実験用器具類である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 32】

50

前記実験用器具類が、容器類、ろ過装置類、遠心機類、分光光度計類、および蛍光光度計類からなる群から選択される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記物品が獣医用器具類を含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記獣医用器具類が、クランプ類、鉗子類、ナイフ類、のこぎり類、プローブ類および電子スタン器具からなる群から選択される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記蛋白分解酵素がプロテアーゼ酵素を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記プロテアーゼ酵素がカルボニルヒドロラーゼを含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記カルボニルヒドロラーゼがスブチリシンを含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記スブチリシンが、1 個以上のアミノ酸の置換、付加または欠失を含む野生型バチルス - アミロリケファシエンス - スブチリシン (*Bacillus amyloliquefaciens subtilisin*) の突然変異体を含む請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

蛋白分解酵素の分解処理により、感染性プリオン蛋白の分解性を向上させる方法であって、

( a ) プリオン蛋白の熱分解温度以下の温度にプリオン蛋白を加熱すること、次いで、

( b ) プリオン蛋白の酵素分解処理すること

を含む方法。

【請求項 4 0】

感染性プリオン蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白によって汚染されたウシ組織から感染性プリオン蛋白を除去する方法であって、

( a ) 約 1 0 0 から約 1 5 0 の範囲の温度でウシ組織を加熱処理すること、

( b ) 蛋白分解酵素が熱的に安定であって、ウシ組織に関連した感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に破壊するために蛋白分解的に有効な約 3 5 から約 1 0 0 の範囲の温度で、ウシ組織を蛋白分解酵素に曝露させること、

を含む方法。

【請求項 4 1】

前記加熱処理が、約 5 分から約 5 時間の時間で実施される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

蛋白分解酵素がバチルス - リケニフォルミス P W D - 1 ケラチナーゼを含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 3】

( a ) 感染性プリオン蛋白を第一の高温範囲の温度に加熱すること、次いで

( b ) 感染性プリオン蛋白を第二の高温範囲において低い高温に冷却すること、

( c ) 感染性プリオン蛋白を良性の分解産物に分解するようなより低い高温で効果的な蛋白分解酵素に感染性プリオン蛋白を曝露させること、

を含む感染性プリオン蛋白を分解する方法。

【請求項 4 4】

感染性プリオン蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白によって汚染された組織または物品を加熱することと同時に、感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に分解するために十分な温度で、かつ十分な時間で組織または物品を熱安定性蛋白分解酵素に曝露させることを含むステップにより、前記組織または物品中の感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に分解する方法。

【請求項 4 5】

動物肉製品または副産物を、それらから B S E 媒介感染性プリオン蛋白を除くための加工

10

20

30

40

50

方法であって、動物肉製品または副産物の中の B S E 媒介感染性プリオン蛋白を分解するために十分な温度下で、かつ十分な時間でそれらを熱安定プロテアーゼにより処理することを含む方法。

【請求項 4 6】

感染性プリオン蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白によって汚染された組織と、約 3 5 から約 1 0 0 の温度範囲で熱的に安定な蛋白分解酵素と、を含む組織組成物。

【請求項 4 7】

組織中の感染性プリオン蛋白を減少させる組織の処理方法であって、

( a ) 組織中感染性プリオン蛋白の蛋白分解感受性を高めるために十分な温度に、かつ十分な時間で組織を加熱するステップと、 10

( b ) このような組織における感染性蛋白プリオンの少なくとも部分的減少に有効である蛋白分解酵素に前記加熱組織を曝露させるステップと、  
を含む方法。

【請求項 4 8】

感染性プリオン蛋白による汚染を受けやすい物品を消毒する方法であって、

( a ) 前記物品に関連した感染性プリオン蛋白の蛋白分解感受性を高めるために十分な温度に、かつ十分な時間で前記組織を加熱するステップと、

( b ) 前記物品に関連した感染性プリオン蛋白の少なくとも部分的減少に有効である蛋白分解酵素に前記加熱物品を曝露させるステップと、 20  
を含む方法。

【請求項 4 9】

感染性プリオン蛋白で汚染された手術器具から感染性プリオン蛋白を除去する方法であって、

( a ) 約 1 0 0 から約 1 5 0 の範囲の温度で手術器具を加熱すること、次いで、

( b ) 蛋白分解酵素が熱的に安定であって、前記手術器具を汚染している感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に破壊するために蛋白分解的に有効な約 3 5 から約 1 0 0 の範囲の温度で、前記加熱手術器具を蛋白分解酵素に曝露させること、  
を含む方法。

【請求項 5 0】 30

感染性プリオン蛋白による汚染を受けやすい物品を消毒する洗浄組成物であって、

( i ) ケラチナーゼ酵素類、プロティナーゼ K、トリプシン類、キモトリプシン類、ペプシン類、キモシン類、カテプシン類、スブチリシン類、エラスターゼ類、コラゲナーゼ類、エンドペプチダーゼ類、ペプチダーゼ類、オリゴペプチダーゼ類、サーモリシン類、バシロリシン ( b a c i l l o l y s i n )、ミシリシン類 ( m y c i l y s i n s )、カルボキシペプチダーゼ類、ロイシルアミノペプチダーゼ類、アミノペプチダーゼ類、高好熱性プロテアーゼ類、カルボニルヒドロラーゼ、パパイン、パンクレアチン、ストレプトキナーゼ、ストレプトドルナーゼ、フィシン、カルボキシペプチダーゼ、キモパパインおよびプロメリンからなる群から選択される 1 種以上の蛋白分解蛋白質と、

( i i ) 溶媒と、 40  
を含む組成物。

【請求項 5 1】

ケラチナーゼ酵素類を含む、請求項 5 0 に記載の洗浄組成物。

【請求項 5 2】

前記ケラチナーゼ酵素類の濃度が、約 0 . 2 g / L ~ 約 1 . 0 g / L の範囲内にある、請求項 5 1 に記載の洗浄組成物。

【請求項 5 3】

前記溶媒が、蒸留水、アルコール、緩衝液および洗浄剤溶液からなる群から選択される、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 4】 50

界面活性剤、ビルダー、促進剤および充填剤からなる群から選択される一つ以上の化学添加物をさらに含む、請求項 50 に記載の洗浄組成物。

【請求項 55】

組織中の感染性プリオン蛋白を減少させる組織処理方法であって、

(a) 組織中感染性プリオン蛋白の蛋白分解感受性を高めるために少なくとも 40 の温度に、かつ十分な時間で組織を加熱するステップと、

(b) このような組織における感染性蛋白プリオンの少なくとも部分的減少に有効である蛋白分解酵素に加熱組織を曝露させるステップと、

を含む方法。

【請求項 56】

(a) 感染性プリオン蛋白を、60 以上であるが、プリオン蛋白熱分解温度以下である第一高温範囲の温度に加熱すること、次いで (b) 感染性プリオン蛋白を第二の高温範囲におけるより低い高温に冷却すること、(c) 感染性プリオン蛋白を良性の分解産物に分解するようなより低い高温で有効な蛋白分解酵素に感染性プリオン蛋白を曝露させること

、  
を含む感染性プリオン蛋白を分解する方法。

【請求項 57】

感染性プリオン蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白に汚染された組織を加熱することと同時に、感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に分解するために 40 以上であるが、プリオン蛋白の熱分解温度以下の温度で、かつ十分な時間で前記組織を熱安定性蛋白分解酵素に曝露させることを含むステップにより、前記組織中の感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に分解する方法。

【請求項 58】

動物肉製品または副産物を、それらから BSE 媒介感染性プリオン蛋白を取り除くための加工方法であって、動物肉製品または副産物の中の BSE 媒介感染性プリオン蛋白を分解するために 60 以上であるが、プリオン蛋白の熱分解温度以下の温度下で、かつ十分な時間でそれらを熱安定プロテアーゼにより処理することを含む方法。

【請求項 59】

感染性プリオン蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白によって汚染された組織と、ケラチナーゼ酵素類、キモトリプシン類、ペプシン類、キモシン類、カテプシン類、ス  
ブチリシン類、エラスターゼ類、コラゲナーゼ類、エンドペプチダーゼ類、ペプチダーゼ  
類、オリゴペプチダーゼ類、サーモリシン類、バシロリシン ( b a c i l l o l y s i n )  
)、ミシリシン類 ( m y c i l y s i n s )、カルボキシペプチダーゼ類、ロイシルアミ  
ノペプチダーゼ類、アミノペプチダーゼ類、および高好熱性プロテアーゼ類からなる群か  
ら選択される蛋白分解酵素と、を含む組織組成物。

【請求項 60】

動物肉製品または副産物を、40 以上であるが、プリオン蛋白の熱分解温度以下の温度で、かつ十分な時間で動物肉製品または副産物に関連した感染性プリオン蛋白の分解に有効なプロテアーゼで処理することを含む、動物肉製品または副産物の加工方法。

【請求項 61】

感染性プリオン蛋白で汚染されたか、または汚染の疑いがある位置における感染性プリオン蛋白を減少させる処理方法であって、

(a) 前記位置の感染性プリオン蛋白の蛋白分解感受性を高めるために少なくとも 40 の温度に、かつ十分な時間で前記位置を加熱するステップと、

(b) このような位置における感染性蛋白プリオンの少なくとも部分的減少に有効である蛋白分解酵素に前記加熱位置を曝露させるステップと、

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

## 発明の分野

本発明は、一般に伝染性海綿状脳症（TSE）、例えば、ウシ海綿状脳症（BSE）およびヒツジスクラピーに関連した感染性プリオン蛋白を破壊するための組成物および方法に関する。より具体的には、本発明は動物組織に含有する感染性プリオン蛋白を破壊するための、および/またはこのような感染性プリオン蛋白に汚染された医療器具などの物品を消毒および滅菌するためのプロテアーゼの適用に関する。

### 【背景技術】

#### 【0002】

### 発明の背景

プリオン蛋白は、ヒト並びに非ヒト哺乳類種における感染性神経変性疾患に関連する構造異常蛋白である。 10

#### 【0003】

非ヒト哺乳類種におけるプリオン疾患としては、スクラピー（ヒツジ）、伝染性ミンク脳症（ミンク）、慢性消耗性疾患（ヘラジカ、シカ）、ウシ海綿状脳症（BSE）（ウシ）、ネコ海綿状脳症（ネコ）およびサル海綿状脳症（サル）が挙げられる。

#### 【0004】

ヒトでは、クロイツフェルト-ヤコブ病、ゲルトマン-シュトロイスラー-シャインカー症候群、致命的不眠症およびクロイツフェルト-ヤコブ病を含む種々の神経変性疾患が病因学的にプリオン蛋白と関連している。ヒトのプリオン疾患の原因は肉食（新たな変形クロイツフェルト-ヤコブ病の原因となるBSE感染牛肉）、ヒト成長ホルモンの投与（医 20  
原性クロイツフェルト-ヤコブ病の原因となる）および儀式的肉食（クールーの原因となる）に関連している。

1992年以来、ヨーロッパではBSEが18万例以上、ヒトクロイツフェルト-ヤコブ病が100例以上報告されており、ヒトの症例数はこれからもかなり上昇すると予測されている。このような疾患は治療がなく、また病原性プリオン蛋白は処理し難く、非免疫原生であるため、このような疾患の伝播を阻止することは困難である。プリオン蛋白の病原性かつ感染性のイソ体は、非常に安定でシート構造内に豊富であり、熱や通常の蛋白分解酵素に耐性がある（エス・ビー・プルーシナー（Prusiner, S. B.）、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、95巻、p. 11363（1998年）；エフ・イー・コーエン（Cohen, F. E.）およびエス・ビー・プルーシナー（Prusiner, S. B.）、Ann. Rev. Biochem.、67巻、p. 793（1998年）；およびケーエム・パン（Pan, K-M）、エム・ボールドウィン（Baldwin, M.）、ジェー・ウングエン（Nguyen, J.）、エム・ガセット（Gasset, M.）、エイ・サーバン（Serban, A.）、ディー・グロス（Groth, D.）、アイ・メールホーン（Mehlhorn, I.）、ズイー・フアング（Huang, Z.）、アール・ジェー・フレタリック（Fletterick, R. J.）、エフ・イー・コーエン（Cohen, F. E.）、およびエス・ビー・プルーシナー（Prusiner, S. B.）、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、90巻、p. 10962（1993年））。 30

#### 【0005】

BSEおよびウシ由来のヒト食料品のプリオン蛋白汚染の研究、並びにプリオン蛋白疾患の発生やウシ種における遺伝の研究に大きな努力が集中的に払われてきた。ウシ集団における感染は、感染したウシ、ヒツジおよび他の反芻動物由来の骨粉および提供された器官や組織を含有した飼料を畜牛に与えることに関連していた。 40

#### 【0006】

現在、多くの国で、別な方法でヒト用食品となる動物製品、および別な方法で動物飼料の原料や栄養サプリメントの実際の源となる動物副産物は、関連動物における感染性プリオン蛋白の存在に由来するプリオン蛋白感染の伝播を防ぐために焼却され、その残留灰は埋められている。 50

#### 【0007】

ヨーロッパでは、動物副産物からの肉骨粉は飼料としての使用が禁じられている。米国では、BSEの発生は報告されていないが、この疾患の発生と伝播を防ぐために、動物産業およびその関連産業は厳しい規制下に置かれている(ビー・エイ・フランコ(Franco, B.A.), Feed Stuffs, 2001年2月12日)。さらに米国は、肉および肉副製品の輸入を禁じている。

【0008】

動物組織における感染性プリオン蛋白の存在を確認するために、ウェスタンブロット試験、サンドイッチ免疫学的検定試験、ELISA試験、蛍光免疫学的検定試験、毛管免疫電気泳動試験、およびプラスミノゲン結合試験などの種々の試験が開発された(ジェネティック・エンジニアリング・ニュース(Genetic Engineering News), 21巻、第6号、2001年3月15日)。しかし、感染動物組織から感染性プリオン蛋白を工業応用的に除去するために対応できる状況が、現在のところまだ現れていない。

10

感染性プリオン蛋白は、正常な蛋白質を変性あるいはその高次構造を分解させる高圧滅菌(200の高温でも感染性プリオン蛋白の不活化に効果がない)、煮沸、凍結およびホルムアルデヒド、カルボン酸、クロロホルムなどの試薬への曝露などを含む通常の方法による破壊に対して耐性である。典型的には、プリオン蛋白の病原性イソ体を破壊するためには焼却または漂白剤処理が用いられる。

【0009】

したがって、例えば感染性プリオン蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白で汚染された動物組織の処理に適用できる感染性プリオン蛋白破壊のための組成物および方法論を提供することは当業界における著しい進歩となる。

20

【0010】

さらに、プリオン感染組織に以前曝露された医療器具の再使用によって生じる交差汚染の危険は増加しつつあり、感染伝播の潜在的原因となっている。

【0011】

衛生管理施設における防腐剤、消毒剤および滅菌法の使用は、衛生管理処置の間に使用された医療器具による交差汚染を防ぐために重要である。医療装置または医療器具の消毒および滅菌は、細菌またはウイルスなどの感染性生物を破壊する種々の物理的および化学的方法を用いて種々の慣例的方法によって達成される。例えば、過酢酸、過酸化水素、水酸化ナトリウム、ギ酸、漂白剤、アルコール類、エチレンオキシド、ホルムアルデヒド、ホルマリンおよびグルタルアルデヒドなどの化学的消毒剤を医療器具の消毒と滅菌に用いることができ、焼却、高圧滅菌、凍結、乾燥加熱、煮沸、UVおよびマイクロ波照射もまた、細菌やウイルスなどの感染性媒介物を破壊するために有用である。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

しかし、上記で検討したとおり、感染性プリオン蛋白は、従来の方法による破壊には耐性があることが知られており、したがって、従来の方法は、プリオンで汚染された医療器具または同類の物品を消毒または滅菌するには無効である。

40

【0013】

したがって、本発明のもう一つの目的は、プリオンで汚染された手術器具などの医療器具または台所用品および実験器具などの物品を有効に消毒または滅菌する組成物および方法論を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

発明の概要

本発明は、感染性プリオン蛋白を破壊するための方法と組成物を提供する。

【0015】

一の態様において、本発明は、感染性プリオン蛋白で汚染された位置における感染性プリ

50

オン蛋白を減少させる処理方法に関するものであって、

(a) 前記位置に感染性プリオン蛋白の蛋白分解感受性を高めるために十分な温度に、かつ十分な時間で前記位置を加熱するステップと、

(b) このような位置における感染性蛋白プリオンの少なくとも部分的減少に有効である蛋白分解酵素に前記加熱位置を曝露させるステップと、

を含む方法に関する。

【0016】

前記位置は、組織中の感染性プリオン蛋白を含有する、または感染性プリオンによって汚染された組織、あるいは感染性プリオン蛋白による汚染を受けやすい物品であり得る。

【0017】

ステップ(a)における温度は、約150 を超えず、約100 から約150 の範囲内が好ましく、約125 から約140 の範囲内がさらに好ましい。

【0018】

ステップ(b)は、ステップ(a)よりも低い温度、例えば、(1)約35 から約100、(2)約40 から約75、および(3)約50 から約60 の範囲内で行われる。ステップ(b)は、好ましくは約40 を超える温度で、より好ましくは約50 を超える温度で行われる。

【0019】

ステップ(b)で用いられる蛋白分解酵素は、限定しないが、ケラチナーゼ酵素類、プロティナーゼK、トリプシン類、キモトリプシン類、ペプシン類、キモシン類、カテプシン類、スブチリシン類、エラスターゼ類、コラゲナーゼ類、エンドペプチダーゼ類、ペプチダーゼ類、オリゴペプチダーゼ類、サーモリシン類、バシロリシン(*Bacillolysin*)、ミシリシン類(*Mycilysins*)、カルボキシペプチダーゼ類、ロイシルアミノペプチダーゼ類、アミノペプチダーゼ類、高好熱性プロテアーゼ類、カルボニルヒドロラーゼ、パパン、パンクレアチン、ストレプトキナーゼ、ストレプトドルナーゼ、フィシン、カルボキシペプチダーゼ、キモパパンおよびプロメリンが挙げられる。ケラチナーゼ酵素類および/またはその活性フラグメントは、本発明の実施に特に好ましい。ケラチナーゼ類は、羽毛、角、ひずめおよび毛髪の主成分であるケラチン蛋白を分解できるものとして一般に知られている蛋白分解酵素の一群である。本出願の発明者は、特に感染性プリオン蛋白が蛋白分解され易くなっている場合は、ケラチナーゼ酵素類もまた、感染性プリオン蛋白類の破壊に有効であるという予想もしない驚くべき結果を発見した。このような蛋白分解酵素はバチルス・リケニフォルミスPWD-1酵素および/またはその活性フラグメントであることがより好ましい。あるいは、このような蛋白分解酵素は、1個以上のアミノ酸の置換、付加または欠失を含む野生型バチルス・アミロリケファシエンス スブチリシン(*Bacillus amyloliquefaciens subtilisin*)の突然変異体である。

【0020】

さらに、上記明細書中に記載されたような方法は、前記位置中の感染性プリオン蛋白の減少を確認するために前記位置を試験するステップ(c)をさらに含むことができ、ステップ(c)は前記位置をウェスタンブロット試験、サンドイッチ免疫学的検定試験、ELISA試験、蛍光免疫学的検定試験、毛管免疫電気泳動試験、およびプラスミノーゲン結合試験試験からなる群から選択される試験に供することを含む。ウェスタンブロット試験が本発明を実施する上で好ましい。

【0021】

本発明の具体的な一の様子は、上記明細書中に記載されたように感染性プリオン蛋白により汚染されたか、または汚染の疑いのある位置における感染性プリオン蛋白を減少させる処理方法に関するものであり、このような位置は、組織中に感染性プリオン蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白によって汚染された組織を含む。このような組織は、動物組織、好ましくはウシ組織、ヒツジ組織などの哺乳動物の組織を含むことができ、脳組織、下垂体組織、腸組織、肺組織、心組織、腎組織および脾組織など、動物のいかなる身

10

20

30

40

50

体部分からのものであってもよい。このような動物組織は、神経系組織を含むことが好ましく、BSE感染組織またはスクラピー感染組織を含むことがより好ましい。前記組織は感染性プリオン蛋白のキャリア動物から得ることができる。

#### 【0022】

本発明の他の具体的態様は、上記明細書中に記載されたように感染性プリオン蛋白により汚染されたか、または汚染の疑いのある位置における感染性プリオン蛋白を減少させる処理方法に関するものであり、このような位置は、感染性プリオン蛋白による汚染を受けやすい物品を含む。このような物品は、クランプ類、鉗子類、はさみ類、ナイフ類、ケーブル類、パンチ類、ピンセット類、カニキュレ類、キャリアパー類、カーバー類、キュレット類、スケーラー類、拡張器類、クリップアプリータ類、開創器類、コントラクタ類、エキスカベータ類、持針器類、吸引管類、凝固電極類、脳波計深部電極類、肋骨並びに胸骨スプレッダー類、双極性プローブ類、および肋骨用鋏類などの手術器具を含むことができる。あるいは、このような物品は、ナイフ類、フォーク類、はさみ類、ピラー類、皮むき器類、スライサー類、へら類、および包丁類などの食卓用金物類および台所用品、または容器類、ろ過装置類、遠心機類、分光光度計類、および蛍光光度計類などの実験用器具類、またはクランプ類、鉗子類、ナイフ類、のこぎり類、プローブ類および電子スタン器具などの獣医用器具類を含むことができる。

10

#### 【0023】

処理される位置が物品を含む場合、ステップ(b)に用いられる蛋白分解酵素は、このような物品を洗浄および殺菌する目的で溶液形態において提供されることが好ましい。ケラチナーゼ類は、蛋白分解酵素として用いられるが、このような酵素溶液は、約0.2g/L ~ 約1.0g/Lの範囲内の低有効濃度により特徴づけられることが好ましい。

20

#### 【0024】

本発明のさらなる態様は、(a)プリオン蛋白の熱分解温度以下の温度にプリオン蛋白を加熱すること、次いで(b)プリオン蛋白の酵素分解処理、を含む蛋白分解酵素の分解処理による感染性プリオン蛋白の分解性を向上させる方法に関する。

#### 【0025】

本発明のなおさらなる態様は、感染性プリオン蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白によって汚染されたウシ組織から感染性プリオン蛋白を除去する方法に関するものであって、(a)約100 ~ 約150の範囲の温度でウシ組織を加熱処理すること、次いで(b)蛋白分解酵素が熱的に安定であって、ウシ組織に関連する感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に破壊するために蛋白分解的に有効な約35 ~ 約100の範囲の温度で、ウシ組織を蛋白分解酵素に曝露させることを含む方法に関する。前記加熱処理は約5分 ~ 約5時間の時間で実施することが好ましく、ステップ(b)に用いられる蛋白分解酵素はパチルス-リケニフォルミスPWD-1ケラチナーゼを含むことが好ましい。

30

#### 【0026】

熱安定性蛋白分解酵素は、本発明の実施に特に有用である。したがって、本発明の具体的な態様は、組織を加熱することと同時に、感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に分解するために十分な温度で、かつ十分な時間でこの組織を熱安定性蛋白分解酵素に曝露させることを含むステップにより、感染性プリオン蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白によって汚染された組織中の感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に分解する方法に関する；本発明の他の具体的な態様は、感染性プリオン蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白によって汚染された組織を含む組織組成物、および約35 ~ 約100の温度範囲で熱的に安定な蛋白分解酵素に関する。このような熱安定性蛋白分解酵素は、熱安定性プロテアーゼであることが好ましく、動物肉製品または副産物中のBSE媒介感染性プリオン蛋白を分解するため、十分な温度下で、かつ十分な時間で動物肉製品または副産物を処理するために用いることができる。

40

#### 【0027】

本発明のさらなる他の態様は、組織中の感染性プリオン蛋白を減少させる組織の処理方法に関する。本法は、

50

( a ) 前記組織に関連する感染性プリオン蛋白の蛋白分解性を高めるために十分な温度に、かつ十分な時間で組織を加熱するステップ；および

( b ) このような組織に関連する感染性蛋白プリオンの少なくとも部分的減少に有効である蛋白分解酵素に前記加熱組織を曝露させるステップを含む。

【 0 0 2 8 】

本発明のさらなる態様は、感染性蛋白プリオンによる汚染を受け易い物品を消毒する方法であって：

( a ) 前記物品に関連する感染性プリオン蛋白の蛋白分解の感受性を高めるために十分な温度に、かつ十分な時間で組織を加熱するステップと、

( b ) 前記物品に関連する感染性プリオン蛋白の少なくとも部分的減少に有効である蛋白分解酵素に前記加熱物品を曝露させるステップと、を含む方法に関する。 10

【 0 0 2 9 】

さらなる態様において、本発明は、感染性プリオン蛋白で汚染された手術器具から感染性プリオン蛋白を除去する方法であって、( a ) 約 1 0 0 ~ 約 1 5 0 の範囲の温度で、例えば約 5 分 ~ 約 5 時間の時間で手術器具を加熱すること、次いで ( b ) 蛋白分解酵素が熱的に安定であって、前記手術器具を汚染する感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に破壊するために蛋白分解的に有効な約 3 5 ~ 約 1 0 0 の範囲の温度で、前記加熱手術器具を蛋白分解酵素に曝露させること、を含む方法に関する。

【 0 0 3 0 】

本発明のなおさらなる態様は、感染性プリオン蛋白による汚染を受けやすい物品を消毒する洗浄組成物であって、 20

( i ) ケラチナーゼ酵素類、プロティナーゼ K、トリプシン類、キモトリプシン類、ペプシン類、キモシン類、カテプシン類、スプチリシン類、エラスターゼ類、コラゲナーゼ類、エンドペプチダーゼ類、ペプチダーゼ類、オリゴペプチダーゼ類、サーモリシン類、バシロリシン ( b a c i l l o l y s i n )、ミシリシン類 ( m y c i l y s i n s )、カルボキシペプチダーゼ類、ロイシルアミノペプチダーゼ類、アミノペプチダーゼ類、高好熱性プロテアーゼ類、カルボニルヒドロラーゼ、パパイン、パンクレアチン、ストレプトキナーゼ、ストレプトドルナーゼ、フィシン、カルボキシペプチダーゼ、キモパパインおよびプロメリンからなる群から選択される 1 種以上の蛋白分解蛋白質と、

( i i ) 溶媒と、

を含む前記組成物に関する。 30

【 0 0 3 1 】

本発明の洗浄組成物は、約 0 . 2 g / L ~ 1 . 0 g / L の濃度範囲内にあるケラチナーゼ酵素類を含むことが好ましい。過度の実験なしで通常の当業者により容易に決定できる蒸留水、緩衝液、洗浄液、アルコール、または酵素洗浄剤に通常用いられる任意の他の無機溶媒または有機溶媒などの種々の溶媒が本発明を実施する目的で使用できる。洗浄組成物は、限定しないが、界面活性剤、ビルダー、促進剤、充填剤および他の補助剤などの消毒 / 滅菌成績を高める 1 種以上の化学添加物をさらに含むことがより好ましい。

【 0 0 3 2 】

本発明の他の態様、特徴および実施形態は、次の開示および添付の請求項からより十分に明白となろう。 40

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 3 3 】

発明の好ましい実施形態の詳細な説明

これ以降、より十分に記載される本発明とその特徴、態様および実施形態に関連して、本発明明細書の背景技術の節に引用されている技術文献の開示並びに以下の特許および技術文献は、それぞれ全体を引用文献として明細書中に組み入れてある：

米国特許第 4 , 9 0 8 , 2 2 0 号明細書；米国特許第 4 , 9 5 9 , 3 1 1 号明細書；米国特許第 5 , 0 6 3 , 1 6 1 号明細書；米国特許第 5 , 1 7 1 , 6 8 2 号明細書；米国特許第 5 , 1 8 6 , 9 6 1 号明細書；および米国特許第 5 , 7 1 2 , 1 4 7 号明細書；ジェイ 50

・ピー・デスリーズ (Deslys, J. P.) 「BSEに関する屠殺牛のスクリーニング (Screening slaughtered cattle for BSE)」、Nature、409巻、pp. 476~477、2001年1月25日；およびイー・コーエン (Cohen, F. E.) 「Protein Misfolding and Prion Diseases (蛋白質形成不良およびプリオン疾患)」、J. Mol. Biol. (1999年)、293巻、pp. 313~320。

【0034】

本発明は、組織中の感染性プリオン蛋白を分解するため、あるいは手術器具、食卓用金物類および台所用品、獣医用器具および実験用器具などのプリオン汚染物品の消毒または滅菌するための蛋白分解酵素の使用に基づいている。

10

【0035】

感染性プリオン蛋白単独の高温曝露 (例えば、200 で) では、それらの病原特性を変えなく；さらに非感染性 PrP<sup>C</sup> を完全に消化するプロテイナーゼKなどの従来の蛋白分解酵素は、対応する感染性イソ体を破壊しないため、感染性プリオン蛋白の分解に関する本発明の方法の有効性はまったく予想外であった。というのは、したがって、従来、感染性 PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> の破壊に必要な焼却温度よりはるかに低い温度が、感染性 PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> を含有する組織または汚染組織から感染性 PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> を完全に除去するために、酵素処理に使用できることは非常に驚くべきことである。

【0036】

明細書中に用いられるように、用語の高温とは少なくとも35 の温度を意味する。用語の蛋白分解感受性とは、感染性プリオン蛋白が非感染性生成物に酵素的に分解される能力を意味する。

20

【0037】

組織または物品に関連する感染性プリオン蛋白を減少させるための組織または物品などの位置の処理は、以下に記載されるように種々の技術により実施できる。

【0038】

例えば、本発明の一実施形態において、組織または物品 (感染性プリオン蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白により汚染されたか、または含有または汚染の疑いがある、のいずれかであり得る) を、存在するいずれのプリオン蛋白を少なくとも部分的に破壊するのに有効な蛋白分解酵素に前記組織または物品を曝露させることと共に、存在し得る感染性プリオン蛋白の蛋白分解感受性を高めるための十分な温度に、また十分な時間で加熱する。

30

【0039】

このような処理は、第一のより高い高温に前記組織または物品を加熱する最初のステップ、次に感染性プリオン蛋白の蛋白分解のために第二のより低い高温で酵素剤に前記加熱組織または物品を曝露することを含む、2ステップ連続で行うことができる。

【0040】

このような2ステップ法において、前記組織または物品は、第一のより高い高温で処理し、次いで、第二の酵素処理ステップにおいて蛋白分解酵素を接種させるか、あるいは蛋白分解酵素に曝露させる場合に前記組織または物品が好適な温度になるような第二のより低い高温へと、例えば、前記組織または物品から輻射熱の損失、前記組織または物品の対流冷却、または他の適切な方法により、冷却することができる。

40

【0041】

このような2ステップ法の第二のステップにおいて、前記組織または物品に関連する感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に破壊するのに有効な蛋白分解酵素に、前記組織または物品を曝露する。

【0042】

したがって、前記方法は、前記組織または物品に関連する感染性プリオン蛋白の蛋白分解感受性を、前記組織または物品を引き続く蛋白分解酵素処理のため高温に加熱することによって高める種々の実施形態で行うことができる。加熱ステップにおける高温は、任意の

50

好適な温度、例えば、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも60、少なくとも75、および/または1つの実例となる具体的温度が約100～約150、より好ましくは約125～約140である、150以下(または所望の場合は、他のより低い温度)であってもよい。

【0043】

あるいは、本発明のプリオン蛋白破壊処理は、例えば処理方法に用いられる対応温度で安定かつ有効な(感染性プリオン蛋白を除去するために)単独ステップ法で実施できるので、最初の加熱ステップを必要としない。

【0044】

単独ステップ法において、動物組織または物品を蛋白分解酵素と共に、感染性プリオン蛋白の酵素分解を生じさせるために好適な高温に加熱する。 10

【0045】

例えば、感染性プリオン蛋白を含有するか、またはそれにより汚染された組織または物品中の感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に分解する方法は、前記組織または物品の加熱と同時に、感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に分解するための十分な温度と十分な時間で前記組織または物品を熱安定性蛋白分解酵素に曝露させることにより実施できる。

【0046】

本発明の実施に使用される方法ステップの具体的な順序にかかりなく、前記組織または物品に関連する感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に分解するために有効な蛋白分解酵素(2ステップ法の第二のステップにおいて、または単独ステップ法の酵素分解ステップにおいて)に前記組織または物品を曝露する。 20

【0047】

使用される蛋白分解酵素の熱安定特性に依存して、酵素分解ステップは本発明の実施における任意の好適な温度、例えば、約35を超える温度、約40を超える温度、約50を超える温度で実施できる。

【0048】

例証として、使用される具体的な蛋白分解酵素の蛋白分解安定性および酵素活性に依存して、酵素分解ステップは、約35～約100、約40～約100、約50～約100、約40～約75、約50～約60の範囲の温度で実施できる。 30

【0049】

酵素分解ステップにおいて、蛋白分解酵素は、処理される組織または物品中に存在するか、さもなければ組織または物品中に関連する感染性蛋白プリオンを少なくとも部分的に、好ましくは完全に破壊する。

【0050】

任意の多種多様のプロテアーゼ類が本発明の実施に使用でき、具体的な蛋白分解酵素の選択は、蛋白分解を行うために使用される温度の選択、並びに蛋白分解酵素への曝露前の組織、または物品の任意の高温処理の選択に影響を与えることが認識されるであろう。

【0051】

酵素処理の具体的温度処理条件、並びにこのような酵素処理する前の任意の高温における最初の処理ステップに必要なまたは所望の温度条件は、当業界内で過度の実験なしで経験的に容易に決定できる。 40

【0052】

本発明の実施に使用される有用な蛋白分解酵素としては、それらの使用条件において酵素的に活性かつ有効な酵素類が挙げられる。高温での酵素処理に関して、蛋白分解酵素は使用条件において熱的に安定で好適である。

【0053】

この点について、熱安定性を広範に変える蛋白分解酵素が知られている。例えば、本発明の具体的実施形態において使用される種々の蛋白分解酵素は、35、40、50、60まで、または100まででも熱安定であり得る。 50

## 【0054】

蛋白分解酵素は、任意の好適な種類であってもよく、単独の酵素種あるいは酵素混合物を含んでもよい。酵素は純粋形態および濃縮形態、あるいは希釈形態で使用できる。酵素は、約0.2g/L～約1.0g/Lまでの濃度の酵素溶液を形成する溶媒に溶解することが好ましい。

## 【0055】

本発明の広範な実施における例証的蛋白分解酵素としては、限定しないが、ケラチナーゼ酵素類、プロティナーゼK、トリプシン類、キモトリプシン類、ペプシン類、キモシン類、カテプシン類、スブチリシン類、エラスターゼ類、コラゲナーゼ類、エンドペプチダーゼ類、ペプチダーゼ類、オリゴペプチダーゼ類、サーモリシン類、バシロリシン(bacillolysin)、ミシリシン類(mycilysins)、カルボキシペプチダーゼ類、ロイシルアミノペプチダーゼ類、アミノペプチダーゼ類、高好熱性プロテアーゼ類、カルボニルヒドロラーゼ、パパイン、パンクレアチン、ストレプトキナーゼ、ストレプトドルナーゼ、フィシン、カルボキシペプチダーゼ、キモパパインおよびプロメリンが挙げられる。

10

## 【0056】

好ましい酵素種としてケラチナーゼ酵素類が挙げられる。特に好ましいケラチナーゼは、バチルス-リケニフォルミスPWD-1ケラチナーゼを含む。本発明の実施に有用な蛋白分解酵素種としては、蛋白分解酵素の活性なフラグメント、例えばバチルス-リケニフォルミスPWD-1ケラチナーゼなどのケラチナーゼ酵素の活性フラグメントが挙げられる。ケラチナーゼ酵素類が本発明に使用される場合、酵素溶液に必要な有効濃度は、従来の酵素洗浄剤または消毒剤の濃度よりも著しく低い。さらに、ケラチナーゼ酵素類は、約6.0から約9.5のpH値で、従来の酵素洗浄剤の大部分の温度よりも著しく高い約50から約65の最適活性温度範囲により特徴づけられる。したがって、本発明の方法の洗浄温度を著しく上昇させることができ、このことは手術器具に関連する感染性プリオン蛋白の蛋白分解感受性を高めるためにより有効である。

20

## 【0057】

組織を処理する本発明の方法において、処理される組織は、哺乳動物組織並びに非哺乳動物組織、また感染性プリオン蛋白を実際にまたは潜在的に含有する植物組織であってもよい。哺乳動物組織には、ヒト組織並びに非ヒト哺乳動物組織を含むことができる。

30

## 【0058】

具体的態様において、本発明の方法において処理できる組織は、限定しないが、ウシ組織、ヒツジ組織、サル組織およびヒト組織が挙げられ、種々の組織タイプ、例えば、脳組織、下垂体組織、腸組織、肺組織、心組織、腎組織および脾組織が挙げられる。一態様において、本発明の方法は、中枢神経系組織および/または末梢神経系組織であってもよい神経系組織を処理するために使用される。

## 【0059】

本発明の方法に従って、組織から感染性プリオン蛋白を酵素的に除去する方法、または手術器具などの物品の消毒/殺菌方法は、酵素的蛋白分解処理が完結した後、前記組織または物品に関連する感染性プリオン蛋白の破壊を確認するために前記組織または物品を試験するステップをさらに含むことができる。感染性プリオン蛋白に関する前記組織または物品の試験は、任意の好適な方法、並びに任意の好適な検査法または方法論、例えばウェスタンブロット試験、サンドイッチ免疫学的検定試験、ELISA試験、蛍光免疫学的検定試験、毛管免疫電気泳動試験、およびプラスミノゲン結合試験、または処理される組織中の感染性プリオン蛋白の有無を確認するために有効である他の好適な試験により実施できる。

40

## 【0060】

本発明の酵素処理法は、任意の適切な一連の加工ステップを用いた任意の好適な方法で実施できる。

## 【0061】

50

例えば、一実施形態において、処理される組織または物品は、必要または所望の場合、最初に非酵素的熱処理に供され、次いで感染性または汚染性プリオン蛋白破壊のための酵素処理、次に濯ぎおよび非酵素処理、処理される組織または物品の試験、および/または処理後の試験が組織または物品からの感染性プリオン蛋白の除去が不完全であったことを示す場合必要ならば、さらなる熱/酵素処理（例えば、非酵素的熱処理および酵素的高温処理の交互かつ反復サイクルにおいて）に供される。

【0062】

他の実施形態において、感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に分解するために十分な温度かつ十分な時間で、組織または物品を加熱することと同時に、組織または物品を熱安定性蛋白分解酵素に曝露させることを含むステップにより感染性プリオン蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白によって汚染された組織または物品中の感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に分解する。次いで処理された組織または物品を、感染性プリオン蛋白の除去を確認する試験に供することができる。

10

【0063】

さらに、本発明の方法は、任意の熱/酵素処理前に、処理される組織または物品に関連する感染性プリオン蛋白存在を最初に決定することを含むことができるため、処理が感染性プリオン蛋白を含有すると決定され、確認される組織または物品にのみ適用される。

【0064】

あるいは、感染性プリオン蛋白を潜在的に含有するか、またはそれにより潜在的に汚染されている可能性はあるが、感染性プリオン蛋白の存在を予めはっきりと確認されていない組織または物品に前記熱/酵素処理を行ってから、感染性プリオン蛋白の存在を確認し、次いで前記組織または物品に関連する感染性プリオン蛋白の有無を決定するために処理生成物を試験してもよい。

20

【0065】

本発明の方法は、BSBなどのTSE類を媒介する感染性プリオン蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白で汚染され易い肉および肉副産物中の感染性プリオン蛋白を破壊するために有効的に適用される。

【0066】

このように本発明の方法はまた、BSEおよび他の感染性プリオン蛋白疾患の伝染を避けるために焼却するよりも、食品加工および/または関連操作でさらに加工できるウシおよび他の動物製品と副産物の処理に対し信頼できる方法を提供する。

30

【0067】

このように本発明は、一実施形態においてプリオン蛋白を最初に非酵素的熱処理、例えば感染性プリオン蛋白の熱分解温度（ $> 200$ ）（一般に焼却が実施される）以下の温度に加熱すること、次いで感染性プリオン蛋白を酵素分解する動物製品および副産物の加工法を考慮している。

【0068】

本発明の具体的例証の実施形態において、感染性プリオン蛋白は、約100 ~ 約150の範囲の温度で、例えば約5分 ~ 約5時間の時間でウシ組織を加熱処理することにより、次いで蛋白分解酵素が熱的に安定であり、ウシ組織中の感染性プリオン蛋白を破壊するために蛋白分解的に有効な約35 ~ 約100の範囲の温度で蛋白分解酵素にウシ組織を曝露させることにより、感染性プリオン蛋白を含有するウシ組織から除去される。

40

【0069】

加熱処理は、場合によっては、加熱処理操作において所望の大気圧、大気圧以下または大気圧以上を与える圧の制御と共に、高温条件が適切に維持される好適なチャンバー内または容器内で実施できる。

【0070】

加熱処理後、ウシ組織は、その中の全ての感染性プリオン蛋白を破壊するためにパチルス-リケニフォルミスPWD-1ケラチナーゼによる酵素分解処理に供される。熱/酵素処理について、前記組織は任意の好適な方法で加工できる。

50

## 【 0 0 7 1 】

例えば、このようなウシ組織は、例えば感染性プリオン蛋白の完全な破壊の確認を試験またはアッセイ後、動物飼料成分（例えば、肉骨粉）または飼料サプリメントを生成するために加工できる。

## 【 0 0 7 2 】

1つの特に好ましい加工実施形態において、加熱処理ステップは、約125 ~ 約150の最初の高温範囲内で実施され、その後、ウシ組織の酵素処理は、約40 ~ 約60の第二の高温範囲内においてバチルス-リケニフォルミス P W D - 1 ケラチナーゼを用いて実施される。

## 【 0 0 7 3 】

本発明の方法は、他の場合では（感染性プリオン蛋白の存在が疑われる、または確認された場合）焼却または廃棄処分を必要とするであろう関連ウシ肉副産物の利用を可能にする。

10

## 【 0 0 7 4 】

本発明の方法は、処理をしなければ、他の場合ではバイオハザードを構成するであろう物質の栄養学的利用を可能にする技術的に大きな進歩を達成する。本発明の方法は、感染または汚染動物組織の焼却、および廃棄処分に必要なコストおよび施設を同時に避けられる。

## 【 0 0 7 5 】

本発明は、組織から感染性プリオン蛋白を少なくとも部分的に取り除くために十分な温度かつ十分な時間で、熱的安定な蛋白分解酵素に前記組織を曝露することにより、感染性プリオン蛋白、例えば、B S E 媒介プリオン蛋白を組織から除去するための簡便な方法論を具現化する。

20

## 【 0 0 7 6 】

本発明の方法は、伝染性海綿状脳症（T S E）および/または、限定しないが、ウシ海綿状脳症（B S E）およびヒツジスクラピーなどの他のプリオン蛋白媒介疾患に対し感染性であるプリオン蛋白の破壊に広く適用できる。

## 【 0 0 7 7 】

本発明の方法は、ヒト食品用の動物肉の加工および、動物飼料または動物飼料成分用の動物副産物の加工への適用性を有する。

30

## 【 0 0 7 8 】

1つの組成態様において本発明は、（i）組織、例えば、プリオン蛋白媒介 B S E などの感染性プリオン蛋白を含有するウシ組織、（ii）酵素処理に使用される温度範囲、例えば、約40 から約60 で熱的安定である蛋白分解酵素、例えば、バチルス-リケニフォルミス P W D - 1 ケラチナーゼなどの組織組成を含む。

## 【 0 0 7 9 】

このような組織組成は高温にあってもよい。前記組成は、好適な高温で酵素的に反応性であって、蛋白分解酵素および感染性プリオン蛋白の無い処理組織を含む生成組成物を生成する。

## 【 0 0 8 0 】

本発明は、主として引き続く動物飼料成分の生産用に提供された動物部分など、採取状態で感染または汚染されている動物組織の処理への適用において上記に例証として記載したが、本発明はまた、プリオン疾患インビボ処理用の蛋白分解酵素の適用を含む。

40

## 【 0 0 8 1 】

このような一実施形態において、治療用組成物は、プリオン疾患に対する治療的に有効な蛋白分解酵素を有効成分として含む、インビボプリオン疾患治療用に提供される。

## 【 0 0 8 2 】

他の実施形態としては、インビボで感染性プリオン蛋白の分子認識蛋白として役立つ非感染性プリオン蛋白（例えば、Pr P<sup>C</sup>、同じものを非感染性にするために修飾された Pr P<sup>S C</sup>、または Pr P<sup>S C</sup> の非感染性フラグメント）と組合せた、ケラチナーゼを含有す

50

る治療用組成物を含む。

【0083】

方向づけされた構成物または組合せでケラチナーゼまたは他の蛋白分解酵素を含む、さらに他の治療用組成物が考慮されている。

【0084】

他の例証とする治療用組成物としては、インビボ熱分解誘導時にプリオン疾患に対し、実戦的に有効である蛋白分解酵素と組合せた、非毒性修飾エンドトキシン類縁体などの発熱剤が挙げられる。

【0085】

本発明はまた、蛋白分解酵素またはその活性フラグメントの生産のためにコード化する第一の領域、組み替えポリヌクレオチド発現ベクターの一部として発熱性ペプチドをコードする第二の領域などのポリヌクレオチド配列を含むインビボ治療用組成物を含む。トランスフェクション後、熱安定性蛋白分解酵素またはその活性フラグメントのインビボ発現、および発熱性ペプチドは、感染性プリオン蛋白の除去作用をもたらす。

【0086】

なおさらなる例として、治療用組成物は、伝染性海面状脳症への適用において、血液脳関門を通過できる両親媒性薬物オリゴマー共役物のような血液脳関門通過剤により製剤化できる。このような組成物は、治療用化合物、例えばケラチナーゼ、または他の蛋白分解酵素、またはオリゴマーが親水性部分に結合した親油性部分を含む、オリゴマーに共役したその活性フラグメントを含むことができる。このような治療用組成物を製剤化するのに有用なオリゴマー類は、2000年2月24日に公開された国際公開W000/09073により完全に記載されている。

【0087】

本発明の方法の他の重要な適用は、手術器具、食卓用金物、台所用品、実験装置、および獣医用器具などの物品の消毒および/または滅菌である。このような方法は、

(a) クランプ類、鉗子类、はさみ類、ナイフ類、ケーブル類、パンチ類、ピンセット類、カニキュレ類、キャリパー類、カーバー類、キュレット類、スケーラー類、拡張器類、クリップアプリケーション類、開創器類、コントラクタ類、エキスカベータ類、持針器類、吸引管類、凝固電極類、脳波計深部電極類、肋骨並びに胸骨スプレッダー類、双極性プローブ類、および肋骨用鋏類などの手術器具類；

(b) ナイフ類、フォーク類、はさみ類、ピラー類、皮むき器類、スライサー類、へら類、および包丁類などの食卓用金物類および台所用品；

(c) ろ過装置類、遠心機類、分光光度計類、蛍光光度計類および種々の容器類などの実験用器具類；

(d) クランプ類、鉗子类、ナイフ類、のこぎり類、プローブ類および電子スタン器具などの獣医用器具類、

に関連するプリオン蛋白汚染物の破壊に広く適用できる。

【0088】

上記リストは、本発明の幾つかの適用の例証としてのみ挙げており、本発明の範囲を限定するような仕方で解釈すべきではない。

【0089】

下表は、本発明の一実施形態にしたがった消毒/滅菌サイクルを示している。

【0090】

【表1】

10

20

30

40

表 1

ステップ	温度	時間
予め洗浄(冷水)	室温	2~5分
加熱	35~100℃	20~40分
冷却	34~51℃	2~10分
酵素洗浄	34~51℃	20~120分
超音波処理	34~51℃	5分
洗浄剤による洗浄	51~57℃	2~5分
濯ぎおよび乾燥	室温	5分
オートクレーブ滅菌	200~500℃	-----

## 【0091】

他の実施態様において、熱安定性蛋白分解酵素は、このような消毒/滅菌工程に用いられ、加熱と酵素洗浄ステップが、感染性プリオン蛋白の完全破壊および処理物品の消毒に十分な温度かつ十分な時間で同時に実施できる。

## 【0092】

1つの組成態様における本発明は、(i)酵素処理に使用される温度範囲、例えば、約40~約60に熱的安定である蛋白分解酵素、例えば、バチルス-リケニフォルミスPWD-1ケラチナーゼ；(ii)溶媒を含んだ洗浄組成物を含む。

## 【0093】

酵素洗浄剤の使用に好適な任意の溶媒が本発明の組成物に使用できる。生物学的相溶性並びに低コストを鑑みて、蒸留水が好ましい溶媒である。アルコール、緩衝液、洗浄液などの他の従来の無機および有機溶媒もまた、本発明を実施する目的で使用でき、通常の当業者は、使用される具体的酵素と調和する溶媒を容易に選択できる。従来から使用される化学添加物もまた、本発明の洗浄組成物に導入でき、限定しないが、界面活性剤、ビルダー、促進剤、充填剤および他の補助剤などが挙げられる。

## 【0094】

本発明の洗浄組成物は、例えば、0.3g/L未満の極低濃度であっても感染性プリオン蛋白を破壊するための有効性を保持する。ケラチナーゼ酵素がこのような洗浄組成物で使用される場合、このような組成物の酵素濃度は、約0.2g/L~約1.0g/Lの範囲内が好ましい。

## 【0095】

本発明の洗浄組成物は、高温で酵素的に反応性があり、したがって、手術器具、食卓用金物、台所用品、獣医用器具および実験器具に関連する感染性プリオン蛋白の完全破壊のための高温で使用できる。

## 【0096】

本発明の特徴および利点は、以下の例証的实施例を参照として、より十分に示されている。

## 【実施例】

## 【0097】

## 実施例 1

家禽廃液の好熱嫌気性消化槽から単離された羽毛分解細菌であるバチルス-リケニフォルミスPWD-1ケラチナーゼ(シー・エム・ウィリアムス(C. M. Williams)およびジェー・シー・エッチ・シー(J. C. H. Shih)、J. Appl. Bacteriol.、67巻、p. 25(1989年)；ジェー・シー・エッチ・シー(J. C. H. Shih)、Poultry Sci. 72巻、p. 1617(1993年)を参照)は、本実施例に使用されたケラチナーゼ酵素源であった(エクス・リン(X. Lin)、シー・ジー・リー(C. G. Lee)、イー・エス・カサーレ(E. S. Casale)およびジェー・シー・エッチ・シー(J. C. H. Shih)、Appl. Environ. Microbiol.、58巻、p. 3271(1992年)を参照)。

## 【0098】

このケラチナーゼ酵素をエンコードする遺伝子(エクス・リン(X. Lin)、ディー・ダブリュー・ケレメン(D. W. Kelemen)、イー・エス・ミラー(E. S. M

iller) およびジェー・シー・エッチ・シー (J. C. H. Shih)、Appl. Environ. Microbiol.、61巻、p. 1469 (1995年)を参照)が単離されて塩基配列決定され、本酵素のスケールアップ醗酵生産も確立されている(ジェー・ジェー・ワング (J. J. Wang) およびジェー・シー・エッチ・シー (J. C. H. Shih)、J. Ind. Microb. Biotech. 22巻、p. 608 (1999年)を参照)。

【0099】

このケラチナーゼの粗製および精製調製物は、前記のとおり生産され(エックス・リン (X. Lin)、シー・ジー・リー (C. G. Lee)、イー・エス・カサーレ (E. S. Casale) およびジェー・シー・エッチ・シー (J. C. H. Shih)、Appl. Environ. Microbiol.、58巻、p. 3271 (1992年)およびジェー・ジェー・ワング (J. J. Wang) およびジェー・シー・エッチ・シー (J. C. H. Shih)、J. Ind. Microb. Biotech. 22巻、p. 608 (1999年)を参照)、ノースカロライナ州レイ、ノースカロライナ州立大学 (NC SU) 醗酵施設から入手した。PrPに対するケラチナーゼの有効試験は、オランダ国、レリスタッド動物科学健康研究所 (Instirute of Animal Science and Health at Lelystad) (ID-レリスタッド (Lelystad)) で実施された。

10

【0100】

精製ケラチナーゼは、種々の基質との反応においてエラスターゼ、コラゲナーゼ、プロテイナーゼKおよびトリプシン(すべてシグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Co.) から入手)などの他のプロテアーゼと比較された。ケラチン、エラスチンおよびコラーゲンの加水分解は、増加遊離アミノ基のニンヒドリンカラー反応 (A<sub>450</sub>)により測定された(エックス・リン (X. Lin)、シー・ジー・リー (C. G. Lee)、イー・エス・カサーレ (E. S. Casale) およびジェー・シー・エッチ・シー (J. C. H. Shih)、Appl. Environ. Microbiol.、58巻、p. 3271 (1992年)を参照)。遊離ロイシンは、当量の遊離アミノ基を算出する標準物質として用いられた。カゼイン加水分解は、上澄液中の増加A<sub>280</sub>により測定した(プライス (Price) およびジョンソン (Johnson)、1989年を参照)。これらの結果を下表1に示す。与えられた各々の基質に関して、全てのプロテアーゼの相対活性を決定した。累積相対活性 (CRA) は、ケラチナーゼが広範囲の基質および高活性を有することを示した。

20

30

【0101】

【表2】

表1. 各種基質に対するプロテアーゼ類の相対的特定の活性\*

基質	ケラチナーゼ	エラスターゼ	コラゲナーゼ	プロテイナーゼK	トリプシン
ケラチン <sup>b</sup>	1.00	0.29	0.00	0.36	0.09
エラスチン <sup>b</sup>	2.52	1.00	0.43	0.57	0.61
コラーゲン <sup>b</sup>	2.58	1.15	1.00	0.70	0.38
カゼイン <sup>c</sup>	1.28	0.80	0.02	1.00	0.40
CRA <sup>d</sup>	7.38	3.24	1.45	2.63	1.48

\* 全酵素活性は、個々の最適条件で測定され、比較された

<sup>b</sup> ニンヒドリン反応により測定された蛋白分解 (リン(Lin)ら、1992年)

<sup>c</sup> 溶解性A<sub>280</sub>増加により測定された蛋白分解 (プライス(Price)およびジョンソン(Johnson)、1989年)

<sup>d</sup> 累積相対活性

40

【0102】

病原性 PrP に対するケラチナーゼの有効試験は、ID-レリスタッド (Lelystad)、分子認識ラボラトリーの単離施設 (an Isolation Facility

50

in the Laboratory of Molecular Recognition)で実施された。プリオニクスチェックのヨーロッパユニオン検証法 (European Union - validated procedure of Prionics Check) (プリオニクス (Prionics) AG、チューリッヒ) が病原性 PrP を検出するために用いられた。プリオニクスチェック (Prionics Check) 法は、ウェスタンブロット法に基づいており、PrP の具体的形態を視覚化するために 6H4 モノクローナル抗体を使用する (プリオニクス (Prionics) AG、ウシにおける BSE プリオンの検出試験、実用製品情報、チューリッヒ (2000 年))。

#### 【0103】

肉骨粉工程を模擬するために、原型方法の変更がなされた。第一に、標準法におけるプロテイナーゼ K の代わりにケラチナーゼを用いた。ケラチナーゼの粗製調製物を用いた。第二に、BSE 組織の前加熱処理効果を試験した。均質化組織を、バルカイン (Vulcain) 加圧加熱器により 115 で 40 分間加熱処理した。第三に、抗酸化剤の亜硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) も試験した。本法の残りは、製造元の実用製品情報 (プリオニクス (Prionics) AG、ウシにおける BSE プリオンの検出試験、実用製品情報、チューリッヒ (2000 年)) に記載されたものと同じであった。

#### 【0104】

以下のプロトコルを使用した。1 g の BSE 陽性脳組織を混合し、9 ml のプリオニクス (Prionics) 緩衝液で均質化した。半分の分割量である 5 ml に  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  を加えて、最終濃度 0.1% とし、他の半分は  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  なしで行った。分割量  $4 \times 2.0$  ml をオートクレーブ用のファルコン (Falcon) 管に分配した。さらに 1.0 ml を陽性対照に使用して標準的プリオニクス法により処理し、他の 1.0 ml をケラチナーゼなしの対照に使用した。 $\text{Na}_2\text{SO}_3$  有無の 2 本の管を 40 分間加圧加熱処理し、他の 2 本の管は加熱処理しなかった。PCR プレートのウェルに、サンプル各 150  $\mu\text{l}$  を 50 で 0 時間または 4 時間ケラチナーゼ (150  $\mu\text{g}$ 、1,000 BU/mg) により処理した。ケラチナーゼを、0.05 M、pH 7.5 のリン酸緩衝液に予め溶解した。反応を、セリンプロテアーゼ阻害剤のプリオニクス・ペファブロック (Prionics PeffaBlock) の添加により中止した。酵素温置の終末時に、10  $\mu\text{l}$  の各サンプル混合液を、SDS-PAGE ゲル上に載せ、次いで電気泳動、ウェスタンブロット、および免疫化学発光検出のプリオニクス法を行った。

#### 【0105】

この実験結果を図 1 に示し (BSE プリオン蛋白に対するケラチナーゼ分解の効果)、図中、1 ~ 17 レーンは次の通りである：

レーン 1：緩衝液単独。

レーン 2：試験した BSE 脳組織。

レーン 3： $\text{Na}_2\text{SO}_3$  有りて前加熱処理し、ケラチナーゼは 0 時間で中止。

レーン 4：4 時間のケラチナーゼ消化以外レーン 3 と同じ。

レーン 5： $\text{Na}_2\text{SO}_3$  なしで前加熱処理し、ケラチナーゼは 0 時間で中止。

レーン 6：レーン 5 と同じでケラチナーゼ消化は 4 時間。

レーン 7：前加熱処理なし、 $\text{Na}_2\text{SO}_3$  有り、ケラチナーゼは 0 時間。

レーン 8：4 時間のケラチナーゼ消化以外レーン 7 と同じ。

レーン 9：前加熱処理なし、 $\text{Na}_2\text{SO}_3$  なし、ケラチナーゼは 0 時間。

レーン 10：4 時間のケラチナーゼ消化以外レーン 9 と同じ。

レーン 11：前加熱処理なし、 $\text{Na}_2\text{SO}_3$  あり、ケラチナーゼなし。

レーン 12：4 時間の温置以外レーン 11 と同じ (注：ケラチナーゼを偶然に加えた)。

レーン 13： $\text{Na}_2\text{SO}_3$  有りて精製スクラピー PrP、ケラチナーゼは 0 時間で中止。

レーン 14：4 時間のケラチナーゼ消化以外レーン 13 と同じ。

レーン 15： $\text{Na}_2\text{SO}_3$  有りて精製スクラピー PrP、ケラチナーゼなし。

レーン 16：4 時間の温置以外レーン 15 と同じ

10

20

30

40

50

レーン17：PrP標品。

【0106】

図1に示されるように、特にサンプルを115で40分間前加熱処理する場合、感染性PrPに対するケラチナーゼの消化効果が明白である(レーン3~6)。前加熱処理なしでは(レーン7~10)、ケラチナーゼの有効性が少なくなったが、ケラチナーゼは依然として、感染性PrP陽性物質の半分以上を分解した。精製ヒツジスクラピーPrPに対して、ケラチナーゼは、同様に活性であることが判明した(レーン13~16)。Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>の存在は、単独またはケラチナーゼとの存在のいずれも大きな差があるように見えなかった(レーン15~16)。

実施例2

本発明の有効性をさらに立証するために、以下の実験手順に従って実験を行った。

【0107】

感染したウシおよびヒツジの脳幹組織におけるPrP<sup>Sc</sup>の分解を実施するために、パチルス-リケニフォルミス株PWD-1ケラチナーゼ由来のセリンプロテアーゼであるPWD-1ケラチナーゼが用いられた。サンプル中のPrP<sup>Sc</sup>を確認するためにプリオニックスチェック試験(Prionics AG、スイス国チューリッヒ)を用い、続いて組織サンプルの前加熱処理、消化酵素として精製PWD-1ケラチナーゼを用いて組織サンプルの消化を行った。

【0108】

各例とも、1gのBSE陽性の脳幹組織を9mlのプリオニックス(Prionics)均一化緩衝液と混合し、均質化してから、バルカイン(Vulcain)加圧加熱器により115で40分間加圧加熱処理した。96ウェルのプレートに各サンプル150μlを加え、0.05M、pH7.5のリン酸緩衝液に予め溶解したPWD-1ケラチナーゼで処理した。250μg/mlの酵素濃度を使用した。酵素消化は50で60分間実施した。反応を、セリンプロテアーゼ阻害剤である15μlのペファブロック(Pefabloc(登録商標))の添加により中止した。ゼロ時間サンプルでは、先ずこの阻害剤を添加してからPWD-1ケラチナーゼを添加した。酵素温置の終末時に、10μlの各サンプルを、SDS-PAGEゲル上に載せた。プリオニックスチェックキットに概説されているとおり、電気泳動、ウェスタンブロッティング、および免疫化学発光による検出を行った。

【0109】

BSE陽性(サンプルB1、B2、B3)3個、陰性(ウシサンプルN)1個、スクラピー陽性(サンプルS1とS2)および陰性(ヒツジサンプルN)の脳幹組織サンプルを精製PWD-1ケラチナーゼにより対応する対照に対して試験した。

【0110】

図2はその結果を示しているが、左側部分(「ケラチナーゼ処理」)は、ケラチナーゼ消化の結果であり、右側部分(「対照」)はプリオニックスチェック標品の結果である。ケラチナーゼは、BSE(レーン3~5)並びにスクラピー(レーン8と9)の全ての被験PrP<sup>Sc</sup>を加水分解できた。

【0111】

プリオン蛋白を含有するウシサンプル(サンプルB1、B2、B3)およびプリオン蛋白を含有するヒツジサンプル(サンプルS1とS2)を本発明に従って、熱処理と酵素処理を組合せて処理すると、これらのサンプル中の感染性プリオンサンプル蛋白が完全に破壊されることを、この図は立証している。

【0112】

これらの結果は、全ての種類の被験蛋白質の分解におけるケラチナーゼの多能性を立証している。BSEPrPに対するケラチナーゼの有効性試験において、結果は、特にBSE脳幹組織サンプルが前加熱処理された場合は陽性であった。これは病原性PrPが酵素によって分解されることを立証する初めての実験である。

【0113】

10

20

30

40

50

凡そ125の温度での加圧過熱処理は、動物副産物の肉骨粉への加工における通常のス  
テップである。感染性PrPの破壊に関して本発明に従ったケラチナーゼによる加熱後処  
理は、BSEの伝播を抑えるために有効な方法を提供する。ケラチナーゼ処理された肉骨  
粉はPrPが存在しないことを確認する試験が容易に行われるので、肉骨粉は飼料使用の  
ためにリサイクルできる。

【0114】

このように、本発明の方法は、動物製品および副産物の加工のための簡便で有用な酵素的  
処理を提供する。

【0115】

本発明は、明細書中に種々の例証的特徴、態様および実施形態を参照させて記載したが、  
本発明の利用は、それに限定されず、通常の出業者が容易に考え得る他の変更、修飾およ  
び他の実施形態に拡大され、また包含することは解されるであろう。

10

【0116】

したがって、本発明は、以後の請求項にある本発明の精神と範囲内でそのような他の変更  
、修飾および他の実施形態を包含するものとして広く判断し、解釈されるべきである。

【産業上の利用可能性】

【0117】

産業的有用性

本発明の方法および組成物は、感染性プリオン蛋白の破壊に有用であり、感染性プリオン  
蛋白を含有するか、または感染性プリオン蛋白で汚染された生物材料、例えば動物組織の  
処理に適用できる。他の場合（感染性プリオン蛋白の存在が疑われるか、または確認され  
た）には、本発明は有用で安全な動物飼料または他の栄養最終産物にするために焼却およ  
び廃棄処分を要するであろう生物材料の加工を可能にする。本発明の方法および組成物は  
また、手術器具、食卓用金物、台所用品、実験器具および獣医用器具などの物品の消毒お  
よび/または滅菌に有用であり、このような物品の再使用によって生じる感染性プリオン  
蛋白の交差汚染および伝播を効果的に防ぐ。

20

【図面の簡単な説明】

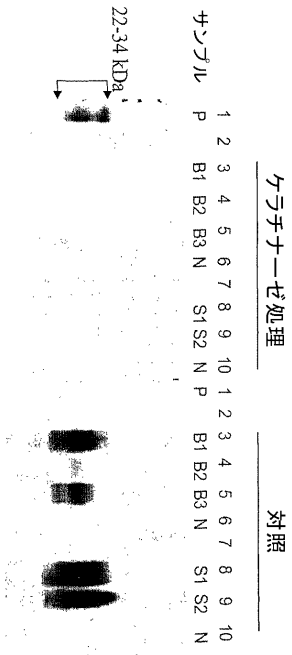
【0118】

【図1】感染性プリオン蛋白の破壊のために本発明の方法の有効性を立証するSDS-P  
AGEゲル上のゲル電気泳動/ウェスタンブロット結果を示す図である。

30

【図2】感染性プリオン蛋白の破壊のために本発明の方法の有効性を立証するSDS-P  
AGEゲル上のゲル電気泳動/ウェスタンブロット結果を示す図である。

【図 2】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/083082 A2

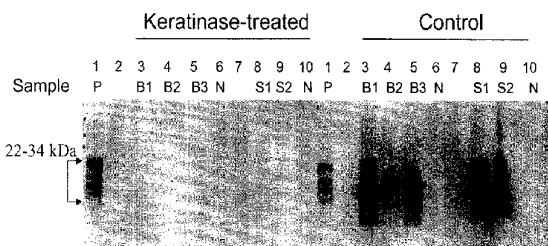
- (51) International Patent Classification: **A61K**
- (21) International Application Number: PCT/US02/08982
- (22) International Filing Date: 22 March 2002 (22.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
  - 09/834,284 12 April 2001 (12.04.2001) US
  - 10/007,613 26 October 2001 (26.10.2001) US
- (71) Applicant: **BIORESOURCE INTERNATIONAL, INC.**  
[US/18], 840 Main Campus Drive, Suite 3560, Raleigh,  
NC 27606 (US).
- (72) Inventor: **SHIH, Jason, C., H.**, 100 Planters Wood Lane,  
Cary, NC 27511 (US).
- (74) Agent: **HULTQUIST, Steven, J.**, Intellectual Prop-  
erty/Technology Law, P.O. Box 14329, Research Triangle  
Park, NC 27709 (US).

- (81) Designated States (*national*): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

**Published:**  
without international search report and to be republished upon receipt of that report

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR DESTRUCTION OF INFECTIOUS PRION PROTEINS



(57) Abstract: 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-contaminated articles, such as surgical instruments, kitchen utensils, laboratory tools, etc.

WO 02/083082 A2

WO 02/083082

PCT/US02/08982

**COMPOSITION AND METHOD FOR DESTRUCTION OF  
INFECTIOUS PRION PROTEINS****DESCRIPTION****Field of the Invention**

The present invention generally relates to a composition and method for destruction of infectious prion proteins associated with transmissible spongiform encephalopathy (TSE), e.g., bovine spongiform encephalopathy (BSE) and sheep scrapie. More specifically, the invention relates to application of proteases for destructing infectious prion proteins contained in animal tissues, and/or for disinfecting and sterilizing medical devices and like articles contaminated by such infectious prion proteins.

**Background of the Invention**

Prion proteins are conformationally anomalous proteins that are associated with infectious neurodegenerative diseases in human as well as non-human mammalian species.

Prion diseases in non-human mammalian species include scrapie (sheep), transmissible mink encephalopathy (minks), chronic wasting disease (elk, deer), bovine spongiform encephalopathy (BSE) (cows), feline spongiform encephalopathy (cats), and simian spongiform encephalopathy (monkeys).

In humans a variety of neurodegenerative conditions are etiologically associated with prion proteins, including Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, fatal insomnia, kuru, and variant Creutzfeldt-Jakob disease. Pathogenesis of human prion diseases is associated with carnivorousism (BSE-infected beef, causing new variant Creutzfeldt-Jakob disease), administration of human growth hormone (causing iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease) and ritualistic cannibalism (causing kuru).

WO 02/083082

PCT/US02/08982

Over 180,000 BSE cases and 100 human Creutzfeldt-Jakob disease cases have been reported in Europe since 1992, and the human cases are predicted to significantly rise. The spread of such disease is difficult to contain, since such disease has no cure and the pathogenic prion protein is recalcitrant and non-immunogenic. The pathogenic and infectious isoform of prion protein is very stable, rich in  $\beta$ -sheet structure, and resistant to heat and common proteolytic enzymes (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)).

Significant efforts have been focused on studies of BSE and prion protein contamination of human food supplies deriving from bovine sources, and of prion protein disease generation and propagation in bovine species. Infection in bovine populations has been associated with feeding of bovine herds with feedstocks containing bone meal and rendered organs and tissue deriving from infected cows, sheep and other ruminant animals.

At present, in many countries, animal products that otherwise would provide human food, and animal by-product that otherwise would provide a viable source of raw materials and nutritional supplements for animal feeds, are being incinerated and the ash residue buried, to preclude transmission of prion protein infection deriving from the presence of infectious prion proteins in associated animals.

In Europe, meat bone meal from animal by-products has been banned for feed use. In the United States, no outbreak of BSE has been reported, however, animal and rendering industries have been placed under restrictive regulations to prevent the incidence and spread of disease (Franco, B.A., *Feed Stuffs*, February 12, 2001). Further, the United States has banned imports of meat and meat by-products.

A variety of tests for determining the presence of infectious prion proteins in animal tissue have been developed, including Western blot tests, sandwich immunoassay tests, ELISA tests, fluoroimmunoassay tests, capillary immuno-electrophoresis tests, and plasminogen binding tests (Genetic Engineering News,

WO 02/083082

PCT/US02/08982

Vol. 21, No. 6, March 15, 2001), but corresponding capability for industrially-applicable removal of infectious prion proteins from infected animal tissue has not evolved to date.

Infectious prion proteins are resistant to destruction by conventional methods that denature and otherwise degrade conformationally normal proteins, including methods such as autoclaving (even temperatures as high as 200°C are not effective to inactivate infectious prion proteins), boiling, freezing, and exposure to reagents such as formaldehyde, carbolic acid and chloroform. Typically, incineration or treatment with bleach is employed to destroy the pathogenic isoform of the prion protein.

It therefore would be a significant advance in the art to provide a composition and methodology for destruction of infectious prion proteins, which is applicable to the treatment of biological materials, e.g., animal tissue containing or contaminated with infectious prion proteins.

Moreover, the cross-contamination caused by reuse of medical instruments that have been previously exposed to prion-infected tissues is becoming an increased hazard and potential contributor to the transmission of infection.

The use of antiseptics, disinfectants, and sterilization procedures in health care facilities is critical to prevent the cross-contamination by medical instruments used during health care procedures. Disinfection and sterilization of medical devices or instruments are achieved by a variety of conventional methods, using various physical and chemical processes that destroy infectious biological materials, such as bacteria or viruses. For example, chemical disinfectants such as peracetic acid, hydrogen peroxide, sodium hydroxide, formic acid, bleach, alcohols, ethylene oxide, formaldehyde, formalin, and glutaraldehyde can be used for disinfecting and sterilizing medical devices; incineration, autoclaving, freezing, dry heating, boiling, UV and microwave radiation are also useful for destructing traditional infectious agents such as bacteria and viruses.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

However, as discussed hereinabove, infectious prion proteins are known to be resistant to destruction by the conventional methods, which are therefore ineffective for disinfecting or sterilizing prion-contaminated medical devices or similar articles.

It is therefore another object of the present invention to provide a composition and methodology for effectively disinfecting or sterilizing prion-infected medical devices such as surgical instruments, or like articles such as kitchen utensils and laboratory tools.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The invention provides a method and composition for destruction of infectious prion proteins.

In one aspect, the present invention relates to a method of treatment for reduction of infective prion protein at a locus contaminated with infective prion protein, the method comprising the steps of:

- (a) heating the locus to a sufficient temperature and for sufficient time to enhance the proteolytic susceptibility of infective prion protein at the locus; and
- (b) exposing the heated locus to a proteolytic enzyme that is effective for at least partial reduction of the infective protein prion at such locus.

Said locus can be either tissue containing or contaminated by infective prion protein therein, or article(s) that are susceptible to contamination by infectious prion protein.

The temperature in step (a) does not exceed about 150°C, and preferably within a range of from about 100°C to about 150°C, more preferably within a range of from about 125°C to about 140°C.

Step (b) is carried out at a temperature that is lower than that of step (a), for example, within a range of: (1) from about 35°C to about 100°C, (2) from about 40°C to about 75°C, and (3) from about 50°C to about

WO 02/083082

PCT/US02/08982

60°C. Preferably, step (b) is carried out at a temperature above about 40°C, or more preferably, above about 50°C.

The proteolytic enzyme used in step (b) include, but are not limited to, keratinase enzymes, proteinase K, trypsins, chymotrypsins, pepsins, chymosins, cathepsins, subtilisins, elastases, collagenases, endopeptidases, peptidases, oligopeptidase, thermolysins, bacillofysin, mycilysins, carboxypeptidases, leucyl aminopeptidases, aminopeptidases, extremothermophilic proteases, carbonyl hydrolase, papain, pancreatin, streptokinase, streptodornase, ficin, carboxypeptidase, chymopapain, and bromelin. Keratinase enzymes and/or an active fragment thereof are particularly preferred for the practice of the present invention. Keratinases are a group of proteolytic enzymes that are generally known as being capable of breaking down keratin proteins that are the major components of feather, horn, hooves, and hair. The inventor of the present application has discovered an unexpected and surprising result that keratinase enzymes are also effective in destructing infectious prion proteins, especially if the infectious prion proteins have been rendered proteolytically susceptible. More preferably, such proteolytic enzyme is a *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase enzyme and/or an active fragment thereof. Alternatively, such proteolytic enzyme is a mutant of wild-type *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin, comprising one or more amino acid substitutions, additions, or deletions.

Moreover, such method as described hereinabove may further comprise a step of (c) testing the locus to verify reduction of infective prion protein therein, which comprises subject the locus to a test selected from the group consisting of Western blot tests, sandwich immunoassay tests, ELISA tests, fluoroimmunoassay tests, capillary immuno-electrophoresis tests, and plasminogen binding tests. Western blot test is preferred in practicing the present invention.

One specific aspect of the present invention relates to a method of treatment for reduction of infective prion protein at a locus contaminated or suspected of being contaminated with infective prion protein, as described hereinabove, wherein such locus comprises tissue containing or contaminated by infective prion

WO 02/083082

PCT/US02/08982

protein therein. Such tissue may comprise animal tissue, preferably mammalian tissue such as bovine tissue, ovine tissue, etc., and it can be from any body parts of the animal, such as brain, pituitary, intestine, lung, heart, kidney, and spleen tissues. Preferably, such animal tissue comprises nervous system tissue, and more preferably comprises BSE-infected or scrapie-infected tissue. It can be obtained from a carrier animal for the infective prion protein.

Another specific aspect of the present invention relates to a method of treatment for reduction of infective prion protein at a locus contaminated or suspected of being contaminated with infective prion protein, as described hereinabove, wherein such locus comprises article(s) that is susceptible to contamination by infectious prion protein. Such article(s) may comprise surgical instrument(s), such as clamps, forceps, scissors, knives, cables, punches, tweezers, cannulae, calipers, carvers, curettes, scalers, dilators, clip applicators, retractors, contractors, excavators, needle holders, suction tubes, coagulation electrodes, electroencephalographic depth electrodes, rib and sternum spreaders, bipolar probes, and rib shears. Alternatively, such article(s) may comprise cutlery and kitchen utensils, such as knives, forks, scissors, peelers, parers, slicers, spatulas, and cleavers, or laboratory apparatus(es), such as containers, filtration devices, centrifuges, spectrophotometers, and fluorimeters, or veterinary devices, such as clamps, forceps, knives, saws, probes, and electronic stun equipment.

When the locus to be treated comprises article(s), the proteolytic enzyme used in step (b) is preferably provided in a solution form for purpose of cleansing and sterilizing such articles. While keratinases are used as the proteolytic enzyme, such enzyme solution is preferably characterized by a low effective concentration within the range of from about 0.2 g/L to about 1.0 g/L.

A further aspect of the present invention relates to a method of enhancing degradability of an infectious prion protein by proteolytic enzymatic degradation treatment, including (a) heating the prion protein to a temperature below the pyrolytic destruction temperature of the prion protein, followed by (b) enzymatic degradation treatment of the prion protein.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

A still further aspect of the present invention relates to a method of removing infective prion protein from bovine tissue containing or contaminated with same, the method including (a) cooking the bovine tissue at a temperature in a range of from about 100°C to about 150°C, followed by (b) exposing the bovine tissue to a proteolytic enzyme at a temperature in a range of from about 35°C to about 100°C at which the proteolytic enzyme is thermally stable and proteolytically effective to at least partially destroy the infective prion protein associated with the bovine tissue. The cooking is preferably conducted for a time of from about 5 minutes to about 5 hours, and the proteolytic enzyme used in step (b) preferably comprises *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase.

Thermally stable proteolytic enzymes are particularly useful for the practice of the present invention. Therefore, one specific aspect of the present invention relates to a method of at least partially degrading infectious prion protein in tissue containing or contaminated with same, by steps including heating the tissue and simultaneously exposing same to a thermal stable proteolytic enzyme, at sufficient temperature and for sufficient time to at least partially degrade the infectious prion protein; another specific aspect of the present invention relates to a tissue composition comprising tissue containing or contaminated with an infectious prion protein and a proteolytic enzyme that is thermally stable in a temperature range of from about 35°C to about 100°C. Preferably, such thermally stable proteolytic enzyme is a thermotolerant protease, which can be used to treat animal meat product or by-product under sufficient temperature and for sufficient time to destroy the BSE-mediating infectious prion protein therein.

Yet another aspect of the present invention relates to a method of treatment of tissue for reduction of infective prion protein therein. The method comprises the steps of:

- (a) heating the tissue to a sufficient temperature and for sufficient time to enhance the proteolytic degradability of infective prion protein associated with the tissue; and
- (b) exposing the heated tissue to a proteolytic enzyme that is effective for at least partial reduction of infective prion protein associated with such tissue.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

A further aspect of the present invention relates to a method of disinfecting article(s) that are susceptible to contamination by infectious prion protein, the method comprising the steps of:

- (a) heating said article(s) to a sufficient temperature and for sufficient time to enhance the proteolytic susceptibility of infective prion protein associated with said article(s); and
- (b) exposing the heated article(s) to a proteolytic enzyme that is effective for at least partial reduction of the infective prion protein associated with said article(s).

In a further aspect, the invention relates to a method of removing infective prion protein from a surgical instrument contaminated with same, the method including (a) heating the surgical instrument at a temperature in a range of from about 100°C to about 150°C, e.g., for a time of from about 5 minutes to about 5 hours, followed by (b) exposing the heated surgical instrument to a proteolytic enzyme at a temperature in a range of from about 35°C to about 100°C at which the proteolytic enzyme is thermally stable and proteolytically effective to at least partially destroy the infective prion protein contaminating the surgical instrument.

A still further aspect of the invention relates to a cleansing composition for disinfecting articles that are susceptible to contamination by infectious prion protein, said composition comprising:

- (i) one or more proteolytic protein(s) selected from the group consisting of keratinase enzymes, proteinase K, trypsins, chymotrypsins, pepsins, chymosins, cathepsins, subtilisins, elastases, collagenases, endopeptidases, peptidases, oligopeptidase, thermolysins, bacillolysin, mycilysins, carboxypeptidases, leucyl aminopeptidases, aminopeptidases, extremothermophilic proteases, carbonyl hydrolase, papain, pancreatin, streptokinase, streptodornase, ficin, carboxypeptidase, chymopapain, and bromelin; and
- (ii) a solvent.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

Preferably, the cleansing composition of the present invention comprises keratinase enzymes in the concentration range of from about 0.2 g/L to 1.0 g/L. Various solvents can be used for the purpose of practicing the present invention, such as distilled water, buffer solution, detergent solution, alcohol, or any other inorganic or organic solvent commonly used in enzymatic detergents, which can be readily determined by a person ordinarily skilled in the art without undue experimentation. More preferably, the cleansing composition further comprises one or more chemical additives for enhancing the disinfection/sterilization results, which include but are not limited to: surfactants, builders, boosters, fillers, and other auxiliaries.

Other aspects, features and embodiments of the invention will be more fully apparent from the ensuing disclosure and appended claims.

#### **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING**

Figures 1 and 2 illustrate gel electrophoresis/Western blot results on SDS-PAGE gel, evidencing the efficacy of the method of the invention for destruction of infectious prion protein.

#### **DETAILED DESCRIPTION AND PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTION**

Relative to the present invention and its features, aspects and embodiments as more fully described hereinafter, the disclosures of the technical literature cited in the Background of the Invention section hereof, as well as the following patents and technical literature articles, are hereby incorporated herein by reference in their respective entireties:

U.S. Patent Nos.: 4,908,220; 4,959,311; 5,063,161; 5,171,682; 5,186,961; and 5,712,147;

Deslys, J.P., "Screening slaughtered cattle for BSE," *Nature*, Vol. 409, pp. 476-477, January 25, 2001;  
and

WO 02/083082

PCT/US02/08982

Cohen, F.E., "Protein Misfolding and Prion Diseases," *J. Mol. Biol.* (1999), Vol. 293, pp. 313-320.

The present invention is based on the use of proteolytic enzymes for degradation of infectious prion protein in tissue, and alternatively, for disinfection or sterilization of prion-contaminated articles such as surgical instruments, cutlery and kitchen utensils, veterinary tools, and laboratory tools.

The efficacy of the process of the present invention for degradation of the infectious prion protein is wholly unexpected since high temperature exposure (e.g., at 200°C) of infectious prion proteins alone does not alter their pathogenic character; additionally, conventional proteolytic enzymes such as proteinase K that fully digest non-infectious PrP<sup>Sc</sup> do not destroy the corresponding infectious isoform. It therefore is highly surprising that temperatures well below the incineration temperatures heretofore necessary for destruction of infectious PrP<sup>Sc</sup> can be employed for enzymatic treatment, to totally eliminate infectious PrP<sup>Sc</sup> from tissue containing or contaminated with same.

As used herein, the term elevated temperature means temperature of at least 35°C. The term proteolytic susceptibility means the ability of an infective prion protein to be enzymatically degraded to a non-infective product.

The treatment of a locus, such as tissues or articles, for reduction of infective prion protein associated therewith, can be carried out by various techniques as hereinafter described.

For example, the tissue or the article (which may contain, be contaminated with, or be suspected to contain or be contaminated with, infectious prion protein) in one embodiment of the invention is heated to a sufficient temperature and for sufficient time to enhance the proteolytic susceptibility of infective prion protein that may be present, in conjunction with exposure of the tissue or article to a proteolytic enzyme that is effective to at least partially destroy any infective prion protein that is present.

Such treatment can be carried out in a two-step sequence, including an initial step of heating the tissue or article to a first higher elevated temperature and then exposing the heated tissue or article to the

WO 02/083082

PCT/US02/08982

enzymatic agent at a second lower elevated temperature, for proteolytic degradation of the infectious prion protein.

In such two-step process, the tissue or article can be thermally treated at a first higher elevated temperature, and then cooled to second lower elevated temperature, e.g., by radiative heat loss from the tissue or article, convective cooling of the tissue or article, or in other appropriate manner, so that the tissue or article is at a suitable temperature when it is inoculated with or otherwise exposed to the proteolytic enzyme in the second enzymatic treatment step.

In the second step of such two-step process, the tissue or article is exposed to a proteolytic enzyme that is effective to at least partially destroy the infective protein prion associated with the tissue or article.

The method can therefore be carried out in various embodiments in which proteolytic susceptibility of infective prion protein associated with the tissue or article is enhanced by heating of the tissue or article to an elevated temperature for subsequent proteolytic enzyme treatment. The elevated temperature in the heating step may be any suitable temperature, e.g., at least 35°C, at least 40°C, at least 60°C, at least 75°C, and/or no more than 150°C (or other lower temperature, as desired), with one illustrative specific temperature range being from about 100°C to about 150°C, and more preferably from about 125°C to about 140°C.

Alternatively, the prion protein destruction treatment of the invention may be carried out in a single-step procedure, in instances where the proteolytic enzyme is stable and effective (to remove the infectious prion protein) at the corresponding temperature used in the treatment process, so that no initial heating step is required.

In the single step method, the animal tissue or the article, together with the proteolytic enzyme, are heated to a suitable elevated temperature for the enzymatic degradation of the infectious prion protein to occur.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

For example, the method of at least partially degrading infectious prion protein in tissue or article containing or contaminated with same, can be carried out by heating the tissue or article and simultaneously exposing same to a thermal stable proteolytic enzyme, at sufficient temperature and for sufficient time to at least partially degrade the infectious prion protein.

Regardless of the specific sequence of method steps employed in the practice of the invention, the tissue or article is exposed to a proteolytic enzyme (in the second step of the two-step method, or in the enzymatic degradation step of the single-step method) that is effective to at least partially destroy the infective protein prion associated therewith.

The enzymatic degradation step can be carried out at any suitable temperature in the practice of the invention, e.g., at a temperature above about 35°C, above about 40°C, or above about 50°C, depending on the thermostable character of the proteolytic enzyme employed.

By way of illustrative examples, the enzymatic degradation step can be conducted at a temperature in a range of from about 35°C to about 100°C, from about 40°C to about 100°C, from about 50°C to about 100°C, from about 40°C to about 75°C, or from about 50°C to about 60°C, depending on the proteolytic stability and enzymatic activity of the specific proteolytic enzyme that is employed.

In the enzymatic degradation step, the proteolytic enzyme at least partially, and preferably completely, destroys the infective protein prion that is in or otherwise associated with the tissue or article to be treated.

It will be recognized that any of a wide variety of proteases may be employed in the practice of the invention, and that the choice of specific proteolytic enzyme will affect the choice of temperature that is used to carry out the proteolytic degradation, as well as the choice of any elevated temperature treatment of the tissue or article before its exposure to the proteolytic enzyme.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

Specific temperature treatment conditions for the enzymatic treatment, as well as the temperature conditions necessary or desirable for any elevated temperature initial treatment step(s) that precede such enzymatic treatment, can be readily empirically determined without undue experimentation, within the skill of the art.

Proteolytic enzymes usefully employed in the practice of the invention include enzymes that are enzymatically active and effective at the conditions of their use. For elevated temperature enzymatic treatment, the proteolytic enzyme is suitably thermostable at the conditions of use.

In this respect, proteolytic enzymes of widely varying thermostable character are known. For example, various proteolytic enzymes employed in specific embodiments of the invention may be thermostable up to 35°C, 40°C, 50°C, 60°C, or even 100°C.

The proteolytic enzyme may be of any suitable type, and may comprise a single enzymatic species, or alternatively a mixture of enzymes. The enzyme may be used in a purified and concentrated form, or alternatively in a diluted form. It is preferred that the enzyme is dissolved in a solvent to form an enzyme solution with a concentration of from about 0.2 g/L to about 1.0 g/L.

Illustrative proteolytic enzymes in the broad practice of the present invention include, without limitation, keratinase enzymes, proteinase K, trypsins, chymotrypsins, pepsins, chymosins, cathepsins, subtilisins, elastases, collagenases, endopeptidases, peptidases, oligopeptidase, thermolysins, bacillolysin, mycylisins, carboxypeptidases, leucyl aminopeptidases, aminopeptidases, extremothermophilic proteases, carbonyl hydrolase, papain, pancreatin, streptokinase, streptodornase, ficin, carboxypeptidase, chymopapain, and bromelin.

Preferred enzyme species include keratinase enzymes. A particularly preferred keratinase comprises *Bacillus licheniformis* PWD-I keratinase. Proteolytic enzyme species useful in the practice of the invention include active fragments of proteolytic enzymes, e.g., an active fragment of a keratinase

WO 02/083082

PCT/US02/08982

enzyme, such as the *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase. When keratinase enzymes are used in the present invention, the effective concentration required for the enzyme solution is significantly lower than that of the conventional enzyme detergents or disinfectants. Moreover, keratinase enzymes are characterized by an optimal active temperature range of from about 50°C to about 65°C at pH value of from about 6.0 to about 9.5, which is significantly higher than that of most conventional enzyme detergents. Therefore, the cleansing temperature of the process of the present invention can be significantly increased, which is more efficient for enhancing the proteolytic susceptibility of the infective prion protein associated with the surgical instruments.

In the method of the invention for treating tissues, the tissue being treated may be of any suitable type, including mammalian as well as non-mammalian animal tissues, and even plant tissues that actually or potentially contain infectious prion proteins. Mammalian tissues can include human as well as non-human mammalian tissues.

In a specific aspect, the tissues treatable in the method of the invention include, without limitation, bovine tissue, ovine tissue, simian tissue, and human tissue, and include various tissue types, e.g., brain, pituitary, intestine, lung, heart, kidney, and/or spleen tissue. In one aspect, the method of the invention is employed to treat nervous system tissue, which may be central nervous system tissue and/or peripheral nervous system tissue.

The method of enzymatically removing infectious prion proteins from tissue or disinfecting/sterilizing article such as surgical instrument or the like, in accordance with the present invention, can further include the step(s) of testing the tissue or article to verify destruction of infective prion protein associated therewith, after proteolytic enzymatic treatment has been concluded. The testing of the tissue or article for infectious prion protein may be carried out in any suitable manner and with any suitable testing technique or methodology, e.g., by subjecting the tissue or article to a Western blot test, sandwich immunoassay test, ELISA test, fluoroimmunoassay test, capillary immuno-electrophoresis test,

WO 02/083082

PCT/US02/08982

plasminogen binding test, or other suitable test that is efficacious for determining the presence or absence of infectious prion protein in the tissue being treated.

The enzymatic treatment method of the invention can be carried out in any suitable manner, with any appropriate sequence of processing steps.

For example, in one embodiment, the tissue or article to be treated is subjected to initial non-enzymatic thermal treatment as necessary or desired, followed by enzymatic treatment for destruction of infective or contaminative prion protein, followed by rinsing and non-enzymatic treatment, testing of the tissue or article treated, and/or further thermal/enzymatic treatment (e.g., in an alternating and repetitive cycle of non-enzymatic thermal treatment, and enzymatic elevated temperature treatment), as required, if the post-treatment testing shows incomplete removal of the infectious prion protein from the tissue or article.

In another embodiment, infectious prion protein is at least partially degraded in tissue or article containing or contaminated with same, by steps including heating the tissue or article and simultaneously exposing same to a thermal stable proteolytic enzyme, at sufficient temperature and for sufficient time to at least partially degrade the infectious prion protein. The treated tissue or article then may be subjected to testing to characterize the removal of the infectious prion protein.

Further, the method of the invention may include an initial determination of the presence of infectious prion protein associated with the tissue or article being treated, before any thermal/enzymatic treatment, so that treatment is only applied to tissue or article that is established by such determination as containing infectious prion protein.

Alternatively, the thermal/enzymatic treatment may be administered to tissue or article that may potentially contain or be contaminated with, but is not definitively ascertained beforehand to verify the presence of, infective prion protein, followed by testing of the treatment product for determination of the presence or absence of any infectious prion protein associated therewith.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

The method of the invention is efficaciously applied to destroy infectious prion proteins in meat and meat by-products that are susceptible to containing or being contaminated with infectious prion proteins mediating TSEs such as BSE.

As such, the method of the invention provides a reliable approach to the treatment of bovine and other animal products and by-products that then can be further processed in food processing and/or rendering operations, rather than being incinerated to avoid transmission of BSE and other infectious prion protein diseases.

The invention thus contemplates in one embodiment a method of processing animal products and by-products, in which the prion protein is initially non-enzymatically thermally treated, e.g., by heating to a temperature that is below the pyrolytic destruction temperature ( $>>200^{\circ}\text{C}$ ) of the infectious prion protein (at which incineration is generally conducted), followed by enzymatic degradation of the infectious prion protein.

In a specific illustrative embodiment of the invention, infective prion protein is removed from bovine tissue containing same, by cooking the bovine tissue at temperature in a range of from about  $100^{\circ}\text{C}$  to about  $150^{\circ}\text{C}$ , e.g., for a time of from about 5 minutes to about 5 hours, followed by exposing the bovine tissue to a proteolytic enzyme at temperature in a range of from about  $35^{\circ}\text{C}$  to about  $100^{\circ}\text{C}$  at which the proteolytic enzyme is thermally stable and proteolytically effective to destroy the infective prion protein in the bovine tissue.

The cooking treatment can be carried out in a suitable chamber or vessel in which elevated temperature conditions are appropriately maintained, optionally with control of pressure to provide a desired atmospheric, sub-atmospheric, or superatmospheric pressure in the cooking operation.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

After cooking, the bovine tissue is subjected to proteolytic enzymatic treatment with *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase to destroy all infectious prion protein therein. Following the thermal/enzymatic treatment, the tissue may be processed in any suitable manner.

For example, such bovine tissue, e.g., after testing or assay verification of the complete destruction of infectious prion protein, can be processed to yield an animal feed ingredient (e.g., meat bone meal) or feed supplement.

In one particularly preferred process embodiment, the cooking step is carried out in a first elevated temperature range of from about 125°C to about 150°C, and enzymatic treatment of the bovine tissue thereafter is carried out using *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase, in a second elevated temperature range of from about 40°C to about 60°C.

The method of the present invention enables the utilization of rendered bovine meat by-products that would otherwise (in suspicion or verification of the presence of infectious prion proteins), require incineration and disposal.

The inventive method thereby achieves a substantial advance in the art, permitting nutritional use of material that would otherwise, in the absence of treatment, constitute a biological hazard. The inventive method concurrently avoids the costs and infrastructure requirements for incineration and disposal of infected or contaminated animal tissue.

The invention embodies a simple methodology for removing infectious prion protein, e.g., BSE-mediating prion protein, from tissue, by exposing the tissue to a proteolytic enzyme that is thermally stable, at sufficient temperature and for sufficient time to at least partially clear the infectious prion protein from the tissue.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

The method of the invention is broadly applicable to the destruction of prion protein that is infectious for transmissible spongiform encephalopathy (TSE) and/or for other prion protein-mediated diseases, including, without limitation, bovine spongiform encephalopathy (BSE) and sheep scrapie.

The method of the invention has applicability to processing animal meat for human food and processing of animal by-product for animal feed or an animal feed ingredient.

The present invention in one compositional aspect comprehends a tissue composition including (i) tissue, e.g., bovine tissue, containing an infectious prion protein, such as prion protein mediating BSE, and (ii) a proteolytic enzyme, e.g., *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase, that is thermally stable in the temperature range employed for enzymatic treatment, e.g., from about 40°C to about 60°C.

Such tissue composition may be at elevated temperature. The composition is enzymatically reactive at suitable elevated temperature to produce a product composition including the proteolytic enzyme and the treated tissue free of infectious prion protein.

While the invention has been illustratively described hereinabove primarily in application to the treatment of infected or contaminated animal tissue in a harvested state, such as rendered animal parts for the subsequent production of animal feed ingredients, the invention also comprehends the application of proteolytic enzymes for *in vivo* treatment of prionic diseases.

In one such embodiment, a therapeutic composition is provided for *in vivo* prionic disease treatment, including as an active ingredient a proteolytic enzyme that is combatantly effective against the prionic disease.

Another embodiment includes a therapeutic composition containing a keratinase in combination with a non-infectious prion protein (e.g., PrP<sup>Sc</sup>, or a PrP<sup>Sc</sup> that has been modified to render same non-infectious, or a non-infectious fragment of PrP<sup>Sc</sup>) serving as a molecular recognition protein for the infectious prion protein *in vivo*.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

Still other therapeutic compositions are contemplated that include a keratinase or other proteolytic enzyme in vectorized constructs or combinations.

Another illustrative therapeutic composition includes a pyrogenic agent, such as a non-toxic modified endotoxin analog, in combination with a proteolytic enzyme that is combatingly effective against the prionic disease upon induction of pyrogenesis *in vivo*.

The invention also comprehends *in vivo* therapeutic compositions, comprising a polynucleotide sequence including a first region coding for the production of the proteolytic enzyme or active fragment thereof, and a second region coding for a pyrogenic peptide, as part of a recombinant polynucleotide expression vector. Following transfection, the *in vivo* expression of the thermotolerant proteolytic enzyme or active fragment thereof, and the pyrogenic peptide, effect infectious prion protein-combating action.

As a still further example, the therapeutic composition may in application to transmissible spongiform encephalopathy be formulated with a blood-brain barrier traversing agent, such as an amphiphilic drug-oligomer conjugate capable of traversing the blood-brain barrier. Such composition can comprise the therapeutic compound, e.g., keratinase or other proteolytic enzyme, or an active fragment thereof, conjugated to an oligomer, wherein the oligomer comprises a lipophilic moiety coupled to a hydrophilic moiety. Oligomers useful for formulating such therapeutic compositions are more fully described in International Publication WO 00/09073 published February 24, 2000.

Another important application of the method of the present invention is disinfection and/or sterilization of articles, such as surgical instruments, cutleries, kitchen utensils, laboratory apparatus, and veterinary tools. Such method is broadly applicable to the destruction of prion protein contaminates associated with:

- (a) surgical instruments, such as clamps, forceps, scissors, knives, cables, punches, tweezers, cannulae, calipers, carvers, curettes, scalers, dilators, clip applicators, retractors, contractors, excavators, needle

WO 02/083082

PCT/US02/08982

holders, suction tubes, trocars, coagulation electrodes, electroencephalographic depth electrodes, rib and sternum spreaders, bipolar probes, rib shears, etc.;

- (b) cutlery and kitchen utensils, such as knives, forks, scissors, peelers, parers, slicers, spatulas, and cleavers; and
- (c) laboratory tools, such as filtration devices, centrifuges, spectrophotometers, fluorometers, and various containers and
- (d) veterinary tools and devices, such as clamps, forceps, knives, saws, probes and electronic stun equipment.

The above list is only illustrative of several application of the present invention, and it should not be construed in any manner as to limit the scope of the present invention.

The following table shows a disinfection/sterilization cycle according to one embodiment of the present invention:

TABLE I

Steps	Temperature	Time
Pre-Wash (cold water)	Room Temp.	2-5 minutes
Heating	35-100°C	20-40 minutes
Cooling	34-51°C	2-10 minutes
Enzyme Wash	34-51°C	20-120 minutes
Sonication	34-51°C	5 minutes
Detergent Wash	51-57°C	2-5 minutes
Rinse and Dry	Room Temp.	5 minutes
Autoclave Sterilization	200-500°C	---

WO 02/083082

PCT/US02/08982

In another embodiment, a thermally stable proteolytic enzyme is used for such disinfection/sterilization process, so that the heating and enzymatic wash steps can be conducted simultaneously, at sufficient temperature and for sufficient time for complete destruction of the infectious prion protein and sterilization of the treated articles.

The present invention in one compositional aspect comprehends a cleansing composition including (i) a proteolytic enzyme, e.g., *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase, that is thermally stable in the temperature range employed for enzymatic treatment, e.g., from about 40°C to about 60°C; and (ii) a solvent.

Any solvent that is suitable for use with enzymatic detergents can be employed in the composition of the present invention. Distilled water is a preferred solvent, in light of its biological compatibility and low costs. Other conventional inorganic and organic solvents, such as alcohol, buffer solution, detergent solution, can also be used for purpose of practicing the present invention, and a person ordinarily skilled in the art can readily select solvents that are compatible with specific enzymes used. Chemical additives that are conventionally employed can also be introduced into the cleansing composition of the present invention, which include but are not limited to surfactants, builders, boosters, fillers, and other auxiliaries.

The cleansing composition of the present invention retains its effectiveness for destructing infectious prion protein even at a very low concentration, for example, of less than 0.3 g/L. When keratinase enzyme is employed in such cleansing composition, the enzyme concentration of such composition is preferably within the range of from about 0.2 g/L to about 1.0 g/L.

The cleansing composition of the present invention is enzymatically reactive at elevated temperature, and it therefore may be used at elevated temperature for complete destruction of infectious prion protein associated with surgical instruments, cutlery, kitchen utensils, veterinary tools, and laboratory tools.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

The features and advantages of the invention are more fully shown with reference to the following illustrative example.

#### **EXAMPLE 1**

A feather-degrading bacterium, *Bacillus licheniformis* strain PWD-1, isolated from a thermophilic anaerobic digester for poultry waste (see C.M. Williams and J.C.H. Shih, *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 25 (1989); J.C.H. Shih, *Poultry Sci.* **72**, 1617 (1993)) was the source of the keratinase enzyme (see X. Lin, C.G. Lee, E.S. Casale, and J.C.H. Shih, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3271 (1992)) employed in this example.

The gene encoding this keratinase enzyme (see X. Lin, D.W. Kelemen, E.S. Miller and J.C.H. Shih, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1469 (1995)) has been isolated and sequenced, and scale-up fermentation production of this enzyme has also been accomplished (see J.J. Wang and J.C.H. Shih, *J. Ind. Microb. Biotech.* **22**, 608 (1999)). This enzyme is a serine protease.

Crude and purified preparations of this keratinase were produced as previously described (see X. Lin, C.G. Lee, E.S. Casale, and J.C.H. Shih, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3271 (1992) and J.J. Wang and J.C.H. Shih, *J. Ind. Microb. Biotech.* **22**, 608 (1999)) and obtained from the Fermentation Facility at North Carolina State University, Raleigh, North Carolina (NCSSU). The test for the effect of keratinase on PrP was carried out at Institute of Animal Science and Health at Lelystad (ID-Lelystad), The Netherlands.

Purified keratinase was compared with other proteases, including elastase, collagenase, proteinase K and trypsin (all from Sigma chemical Co.) in reacting with various kinds of substrates. Hydrolysis of keratin, elastin and collagen were measured by ninhydrin color reaction ( $A_{450}$ ) of increased free amino groups (see X. Lin, C.G. Lee, E.S. Casale, and J.C.H. Shih, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3271 (1992)). Free leucine was used as the standard to calculate the equivalent free amino groups. Casein hydrolysis was measured by the increased  $A_{280}$  in the supernatant (see Price and Johnson, 1989). The results are presented in Table

WO 02/083082

PCT/US02/08982

1 below. For each given substrate, relative activities of all proteases were determined. Cumulative relative activity (CRA) demonstrated that the keratinase has a wide range of substrates and possesses high activity.

TABLE 1. Relative specific activities of proteases against different substrates<sup>a</sup>

Substrate	Keratinase	Elastase	Collagenase	Proteinase K	Trypsin
Keratin <sup>b</sup>	1.00	0.29	0.00	0.36	0.09
Elastin <sup>b</sup>	2.52	1.00	0.43	0.57	0.61
Collagen <sup>b</sup>	2.58	1.15	1.00	0.70	0.38
Casein <sup>c</sup>	1.28	0.80	0.02	1.00	0.40
CRA <sup>d</sup>	7.38	3.24	1.45	2.63	1.48

<sup>a</sup>All enzyme activities were measured at their individual optimum conditions and compared.

<sup>b</sup>Proteolysis measured by ninhydrin reaction (Lin et al., 1992).

<sup>c</sup>Proteolysis measured by increased soluble A<sub>230</sub> (Price and Johnson, 1989).

<sup>d</sup>Cumulative Relative Activity.

The test of the effect of keratinase on pathogenic PrP was carried out in an Isolation Facility in the Laboratory of Molecular Recognition, ID-Lelystad. The European Union-validated procedure of Prionics Check (Prionics AG, Zurich) was used to detect pathogenic PrP. The Prionics Check procedure is based on the Western blot technique and employs 6H4 monoclonal antibody to visualize the specific form of PrP (Prionics AG, Test for the Detection of BSE-prions in Cattle, Practical Product Information, Zurich (2000)).

WO 02/083082

PCT/US02/08982

In order to mimic a meat bone meal process, modifications were made from the original procedure. First, proteinase K in the standard procedure was replaced by keratinase. A crude preparation of keratinase was used. Second, the effect of a pre-cooking of the BSE tissue was tested. The homogenized tissue was cooked at 115°C for 40 minutes with a Vulcain pressure-cooker. Third, an anti-oxidant, sodium sulfite ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), also was tested. The rest of the procedure was the same as described in the manufacturer's Practical Product Information (Prionics AG, Test for the Detection of BSE-prions in Cattle, Practical Product Information, Zurich (2000)).

The following protocol was employed. One g of BSE-positive brain tissue was mixed and homogenized with 9 ml of Prionics buffer. Half of the aliquot, 5 ml, was added with  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  to give a final concentration 0.1% and the other half, without  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . The aliquots were distributed 4 x 2.0 ml into autoclavable Falcon tubes. An additional 1.0 ml was for used for positive control, treated by the standard Prionics procedure, and another 1.0 ml, for no keratinase control. Two tubes, with and without  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , were pressure-cooked for 40 min and the other 2 tubes were not cooked. In the wells of the PCR plate, the samples, 150  $\mu\text{l}$  each, were treated by keratinase (150  $\mu\text{g}$ , 1,000 EU/mg) at 50°C for 0-time or 4 hrs. Keratinase was pre-dissolved in phosphate buffer, 0.05 M, pH 7.5. The reaction was stopped by the addition of Prionics Pefabloc, an inhibitor of serine protease. At the end of enzymatic incubation, 10  $\mu\text{l}$  of each sample mixture was loaded onto SDS-PAGE gel, and the Prionics procedure of electrophoresis, Western blot, and immuno-chemiluminescence detection was followed.

The results of this experiment are shown in Figure 1 (effect of keratinase degradation on BSE-prion protein), wherein Lanes 1-17 are as follows:

Lane 1: buffer alone.

Lane 2: BSE-brain tissue as tested.

Lane 3: Pre-cooked with  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , keratinase stopped at 0-time.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

Lane 4: Same as Lane 3, except keratinase digestion for 4 hr.

Lane 5: Pre-cooked without Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, keratinase stopped at 0-time.

Lane 6: Same as Lane 5, keratinase digestion for 4 hr.

Lane 7: Without pre-cooking, with Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, keratinase 0-time.

Lane 8: Same as Lane 7, except keratinase digestion 4 hr.

Lane 9: Without pre-cooking, without Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, keratinase 0-time.

Lane 10: Same as Lane 9, except keratinase digestion 4 hr.

Lane 11: Without pre-cooking, with Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, no keratinase.

Lane 12: Same as Lane 11, except incubation 4 hr (Note: keratinase was accidentally added).

Lane 13: Purified scrapie PrP with Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, keratinase stopped at 0-time.

Lane 14: Same as Lane 13, except keratinase digestion 4 hr.

Lane 15: Purified scrapie PrP with Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, without keratinase.

Lane 16: Same as Lane 15, except incubation 4 hr.

Lane 17: PrP standard.

As shown in Fig. 1, the digestive effect of keratinase on infectious PrP is evident, particularly when the samples were precooked at 115°C for 40 min (Lanes 3-6). Without pre-cooking (Lanes 7-10), the keratinase was less effective, but keratinase still degraded more than half of the infectious PrP positive material. On purified sheep scrapie PrP, keratinase was found to be active as well (Lanes 13-16). The

WO 02/083082

PCT/US02/08982

presence of Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> did not appear to make much difference (Lanes 15-16) either alone or with keratinase. The Lane 12 sample was accidentally added with keratinase and therefore was positive.

#### EXAMPLE 2

Experiments have been conducted to further evidence the efficacy of the invention, according to the following experimental procedure:

PWD-1 keratinase, a serine protease derived from *Bacillus licheniformis* strain PWD-1, was used to effect degradation of PrP<sup>Sc</sup> in infected bovine and ovine brain stem tissues. The Prionics Check test (Prionics AG, Zurich, Switzerland) was used to determine PrP<sup>Sc</sup> in the samples, following pre-cooking of the tissue sample, and digestion of the tissue sample with purified PWD-1 keratinase as the digestive enzyme.

In each instance, 1 g of BSE-positive brain stem tissue was mixed and homogenized with 9 ml. of Prionics homogenization buffer, followed by pressure-cooking at 115°C for 40 minutes with a Vulcan pressure cooker. Into a 96-well plate, 150 µl of each sample was added and treated with PWD-1 keratinase pre-dissolved in phosphate buffer, 0.05 M, pH 7.5. An enzyme concentration of 250 µg/ml was used. Enzymatic digestion was carried out at 50°C for 60 min. The reaction was stopped by the addition of 15 µl Pefabloc®, an inhibitor of serine protease. Time-zero samples were treated by first adding the inhibitor before the addition of the PWD-1 keratinase. At the end of the enzymatic incubation, 10 µl of each sample was loaded onto the SDS-PAGE gel. Electrophoresis, Western blotting and immuno-chemiluminescence detection were conducted as outlined in the Prionics Check kit.

Brain stem tissue samples, 3 BSE-positive (samples B1, B2, B3), 1 negative (bovine sample N), 2 scrapie positive (samples S1 and S2) and 1 negative (ovine sample N) were tested by the purified PWD-1 keratinase, against corresponding controls.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

Figure 2 shows the results, with the left-hand panel ("Keratinase-treated") being the result of keratinase digestion, and the right-hand panel ("Control") being the result of the standard Prionic Check. The keratinase was able to hydrolyze all PrP<sup>Sc</sup> tested, BSE (lanes 3-5) as well as scrapie (lanes 8 and 9).

Figure 2 hereof evidence the complete destruction of infectious prion protein in bovine tissue samples containing same (samples B1, B2, B3) and in ovine samples containing same (samples S1 and S2), when such samples were treated by combined thermal and enzymatic treatment in accordance with the Invention.

These results demonstrate the versatility of the keratinase in degrading all types of proteins tested. In the test of the efficacy of the keratinase on BSE PrP, the results were positive, especially when the BSE brain tissue samples were pre-cooked. This is the first experiment to demonstrate that pathogenic PrP is degradable by an enzyme.

Pressure cooking at temperatures on the order of 125°C is a routine step in processing animal by-products into meat bone meal. Post-cooking treatment with keratinase in accordance with the invention, for destruction of infectious PrP, provides an effective method to control the spread of BSE. The keratinase-treated meat bone meal is readily tested to verify the absence of PrP, so that the meat bone meal can be recycled for feed use.

The method of the invention thus provides a simple and useful enzymatic treatment for animal product and by-product processing.

While the invention has been described herein with reference to various illustrative features, aspects, and embodiments, it will be appreciated that the utility of the invention is not thus limited, but rather extends

WO 02/083082

PCT/US02/08982

to and encompasses other variations, modifications and other embodiments, as will readily suggest themselves to those of ordinary skill in the art.

Accordingly, the invention is to be broadly interpreted and construed as including such other variations, modifications and other embodiments, within the spirit and scope of the invention as hereinafter claimed.

#### INDUSTRIAL UTILITY

The method and composition of the present invention are useful for destruction of infectious prion proteins, and are applicable to the treatment of biological materials, e.g., animal tissue containing or contaminated with infectious prion proteins. The invention enables processing of biological materials, which would otherwise (in suspicion or verification of the presence of infectious prion proteins) require incineration and disposal, into useful and safe animal feeds or other nutritional end products. The method and composition of the present invention are also useful for disinfection and/or sterilization of articles, such as surgical instruments, cutlery, kitchen utensils, laboratory apparatus, and veterinary tools, and effectively prevent cross-contamination and propagation of infective prion protein caused by reuse of such articles.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

CLAIMS

1. A method of treatment for reduction of infective prion protein at a locus contaminated or suspected of being contaminated with infective prion protein, the method comprising the steps of:
  - (a) heating the locus to a sufficient temperature and for sufficient time to enhance the proteolytic susceptibility of infective prion protein at the locus; and
  - (b) exposing the heated locus to a proteolytic enzyme that is effective for at least partial reduction of the infective protein prion at such locus.
2. The method of claim 1, wherein the temperature in step (a) comprises a temperature not exceeding about 150°C.
3. The method of claim 1, wherein the temperature in step (a) comprises a temperature in a range of from about 100°C to about 150°C.
4. The method of claim 1, wherein the temperature in step (a) comprises a temperature in a range of from about 125°C to about 140°C.
5. The method of claim 1, wherein step (b) is carried out at a temperature in a range of from about 35°C to about 100°C.
6. The method of claim 1, wherein step (b) is carried out at a temperature above about 40°C.
7. The method of claim 1, wherein step (b) is carried out at a temperature above about 50°C.
8. The method of claim 1, wherein step (b) is conducted at a temperature that is lower than that of step (a).

WO 02/083082

PCT/US02/08982

9. The method of claim 1, wherein step (b) is carried out at a temperature in a range of from about 40°C to about 75°C.
10. The method of claim 1, wherein step (b) is carried out at a temperature in a range of from about 50°C to about 60°C.
11. The method of claim 1, wherein the proteolytic enzyme comprises an enzyme selected from the group consisting of keratinase enzymes, proteinase K, chymotrypsins, pepsins, chymosins, cathepsins, subtilisins, elastases, collagenases, endopeptidases, peptidases, oligopeptidase, thermolysins, bacillolysin, mycilysin, carboxypeptidases, leucyl aminopeptidases, aminopeptidases, extremothermophilic proteases, carbonyl hydrolase, papain, pancreatin, streptokinase, streptodornase, ficin, carboxypeptidase, chymopapain, and bromelin.
12. The method of claim 1, wherein the proteolytic enzyme comprises a keratinase enzyme and/or an active fragment thereof.
13. The method of claim 1, wherein the proteolytic enzyme comprises a *Bacillus licheniformis* PWD-1 enzyme and/or an active fragment thereof.
14. The method of claim 1, further comprising a step of (c) testing the locus to verify reduction of infective prion protein therein.
15. The method of claim 14, wherein the testing step (c) comprises subjecting the locus to a test selected from the group consisting of Western blot tests, sandwich immunoassay tests, ELISA

WO 02/083082

PCT/US02/08982

tests, fluoroimmunoassay tests, capillary immuno-electrophoresis tests, and plasminogen binding tests.

16. The method of claim 14, wherein the testing step (c) comprises subjecting the locus to a Western blot test.
17. The method of claim 1, wherein said locus comprises tissue containing or contaminated by infective prion protein therein.
18. The method of claim 17, wherein said tissue comprises mammalian tissue.
19. The method of claim 17, wherein said tissue comprises nervous system tissue.
20. The method of claim 17, wherein said tissue comprises bovine tissue.
21. The method of claim 17, wherein the tissue comprises BSE-infected tissue.
22. The method of claim 17, wherein said tissue comprises ovine tissue.
23. The method of claim 17, wherein said tissue comprises scrapie-infected tissue.
24. The method of claim 17, wherein said tissue is selected from the group consisting of brain, pituitary, intestine, lung, heart, kidney, and spleen tissues.
25. The method of claim 17, wherein said tissue is from a carrier animal for the infective prion protein.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

26. The method of claim 1, wherein said locus comprises article(s) that are susceptible to contamination by infectious prion protein.
27. The method of claim 26, wherein said article(s) comprise surgical instrument(s).
28. The method of claim 27, wherein said surgical instrument(s) are selected from the group consisting of: clamps, forceps, scissors, knives, cables, punches, tweezers, cannulae, calipers, carvers, curettes, scalers, dilators, clip applicators, retractors, contractors, excavators, needle holders, suction tubes, coagulation electrodes, electroencephalographic depth electrodes, rib and sternum spreaders, bipolar probes, and rib shears.
29. The method of claim 26, wherein said article(s) comprise cutleries and kitchen utensils.
30. The method of claim 29, wherein said cutleries and kitchen utensils are selected from the group consisting of: knives, forks, scissors, peelers, parers, slicers, spatulas, and cleavers.
31. The method of claim 26, wherein said article(s) comprise laboratory apparatus(es).
32. The method of claim 31, wherein said laboratory apparatus(es) are selected from the group consisting of: containers, filtration devices, centrifuges, spectrophotometers, and fluorimeters.
33. The method of claim 26, wherein said article(s) comprise veterinary devices.
34. The method of claim 33, wherein said veterinary devices are selected from the group consisting of clamps, forceps, knives, saws, probes, and electronic stun equipment.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

35. The method of claim 1, wherein said proteolytic enzyme comprises a protease enzyme.
36. The method of claim 35, wherein the protease enzyme comprises a carbonyl hydrolase.
37. The method of claim 36, wherein the carbonyl hydrolase comprises subtilisin.
38. The method of claim 37, wherein the subtilisin comprises a mutant of wild-type *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin, comprising one or more amino acid substitutions, additions, or deletions.
39. A method of enhancing degradability of an infectious prion protein by proteolytic enzymatic degradation treatment, including (a) heating the prion protein to a temperature below the pyrolytic destruction temperature of the prion protein, followed by (b) enzymatic degradation treatment of the prion protein.
40. A method of removing infective prion protein from bovine tissue containing or contaminated with same, the method including (a) cooking the bovine tissue at a temperature in a range of from about 100°C to about 150°C, followed by (b) exposing the bovine tissue to a proteolytic enzyme at a temperature in a range of from about 35°C to about 100°C at which the proteolytic enzyme is thermally stable and proteolytically effective to at least partially destroy the infective prion protein associated with the bovine tissue.
41. The method of claim 40, wherein said cooking is conducted for a time of from about 5 minutes to about 5 hours.

WO 02/083082

PCT/US02/08982

42. The method of claim 40, wherein the proteolytic enzyme comprises *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase.
43. A method of degrading an infectious prion protein, comprising (a) heating the infectious prion protein to temperature in a first elevated temperature range, followed by (b) cooling the infectious prion protein to lower elevated temperature in a second elevated temperature range, and (c) exposing the infectious prion protein to a proteolytic enzyme effective at such lower elevated temperature to degrade the infectious prion protein to a benign degradation product.
44. A method of at least partially degrading infectious prion protein in tissue or article containing or contaminated with same, by steps including heating the tissue or article and simultaneously exposing same to a thermally stable proteolytic enzyme, at sufficient temperature and for sufficient time to at least partially degrade the infectious prion protein.
45. A method of processing an animal meat product or by-product to clear BSE-mediating infectious prion protein therefrom, the method comprising treating the animal meat product or by-product with a thermotolerant protease under sufficient temperature and for sufficient time to destroy the BSE-mediating infectious prion protein therein.
46. A tissue composition comprising tissue containing or contaminated with an infectious prion protein and a proteolytic enzyme that is thermally stable in a temperature range of from about 35°C to about 100°C.
47. A method of treatment of tissue for reduction of infective prion protein therein, the method comprising the steps of:

WO 02/083082

PCT/US02/08982

- (a) heating the tissue to a sufficient temperature and for sufficient time to enhance the proteolytic susceptibility of infective prion protein in the tissue; and
  - (b) exposing the heated tissue to a proteolytic enzyme that is effective for at least partial reduction of the infective protein prion in such tissue.
48. A method of disinfecting article(s) that are susceptible to contamination by infectious prion protein, the method comprising the steps of:
- (a) heating said article(s) to a sufficient temperature and for sufficient time to enhance the proteolytic susceptibility of infective prion protein associated with said article(s); and
  - (b) exposing the heated article(s) to a proteolytic enzyme that is effective for at least partial reduction of the infective prion protein associated with said article(s).
49. A method of removing infective prion protein from a surgical instrument contaminated with same, the method including (a) heating the surgical instrument at a temperature in a range of from about 100°C to about 150°C, followed by (b) exposing the heated surgical instrument to a proteolytic enzyme at a temperature in a range of from about 35°C to about 100°C at which the proteolytic enzyme is thermally stable and proteolytically effective to at least partially destroy the infective prion protein contaminating said surgical instrument.
50. A cleansing composition for disinfecting articles that are susceptible to contamination by infectious prion protein, said composition comprising:

WO 02/083082

PCT/US02/08982

- (i) one or more proteolytic protein(s) selected from the group consisting of keratinase enzymes, proteinase K, trypsins, chymotrypsins, pepsins, chymosins, cathepsins, subtilisins, elastases, collagenases, endopeptidases, peptidases, oligopeptidase, thermolysins, bacillolysin, mycilysins, carboxypeptidases, leucyl aminopeptidases, aminopeptidases, extremothermophilic proteases, carbonyl hydrolase, papain, pancreatin, streptokinase, streptodornase, ficin, carboxypeptidase, chymopapain, and bromelin; and
- (ii) a solvent.
51. The cleansing composition of claim 50, comprising keratinase enzymes.
52. The cleansing composition of claim 51, wherein the concentration of said keratinase enzymes is within the range of from about 0.2 g/L to about 1.0g/L.
53. The cleansing composition of claim 50, wherein the solvent is selected from the group consisting of distilled water, alcohol, buffer solution, and detergent solution.
54. The cleansing composition of claim 50, further comprising one or more chemical additives selected from the group consisting of surfactants, builders, boosters, and fillers.
55. A method of treatment of tissue for reduction of infective prion protein therein, the method comprising the steps of:
- (a) heating the tissue to a temperature of at least 40°C and for sufficient time to enhance the proteolytic susceptibility of infective prion protein in the tissue; and

WO 02/083082

PCT/US02/08982

- (b) exposing the heated tissue to a proteolytic enzyme that is effective for at least partial reduction of the infective protein prion in such tissue.
56. A method of degrading an infectious prion protein, comprising (a) heating the infectious prion protein to temperature in a first elevated temperature range that is above 60°C but below the pyrolytic destruction temperature of the prion protein, followed by (b) cooling the infectious prion protein to lower elevated temperature in a second elevated temperature range, and (c) exposing the infectious prion protein to a proteolytic enzyme effective at such lower elevated temperature to degrade the infectious prion protein to a benign degradation product.
57. A method of at least partially degrading infectious prion protein in tissue containing or contaminated with same, by steps including heating the tissue and simultaneously exposing same to a thermal stable proteolytic enzyme, at a temperature that is above 40°C but below the pyrolytic destruction temperature of the prion protein, and for sufficient time, to at least partially degrade the infectious prion protein.
58. A method of processing an animal meat product or by-product to clear BSE-mediating infectious prion protein therefrom, the method comprising treating the animal meat product or by-product with a thermotolerant protease under a temperature that is above 60°C but below the pyrolytic destruction temperature of the prion protein, and for sufficient time, to destroy the BSE-mediating infectious prion protein therein.
59. A tissue composition comprising tissue containing or contaminated with an infectious prion protein and a proteolytic enzyme that is selected from the group consisting of keratinase enzymes, chymotrypsins, pepsins, chymosins, cathepsins, subtilisins, elastases, collagenases,

WO 02/083082

PCT/US02/08982

endopeptidases, peptidases, oligopeptidase, thermolysins, bacillolysin, mycilysins, carboxypeptidases, leucyl aminopeptidases, aminopeptidases, and extremothermophilic proteases.

60. A method of processing of an animal meat product or by-product, comprising treating the animal meat product or by-product with a protease that is effective for destruction of any infectious prion protein associated therewith, at a temperature that is above 40°C but below the pyrolytic destruction temperature of the prion protein, and for sufficient time.
61. A method of treatment for reduction of infective prion protein at a locus contaminated or suspected of being contaminated with infective prion protein, the method comprising the steps of:
- (a) heating the locus to a temperature of at least 40°C and for sufficient time to enhance the proteolytic susceptibility of infective prion protein at the locus; and
  - (b) exposing the heated locus to a proteolytic enzyme that is effective for at least partial reduction of the infective protein prion at such locus.

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

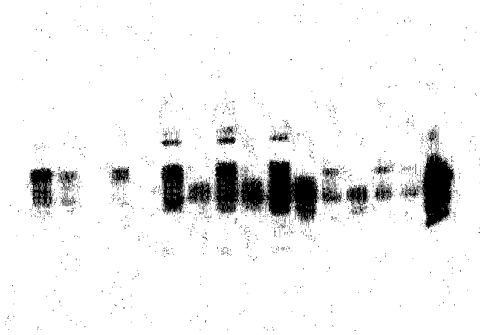


FIGURE 1

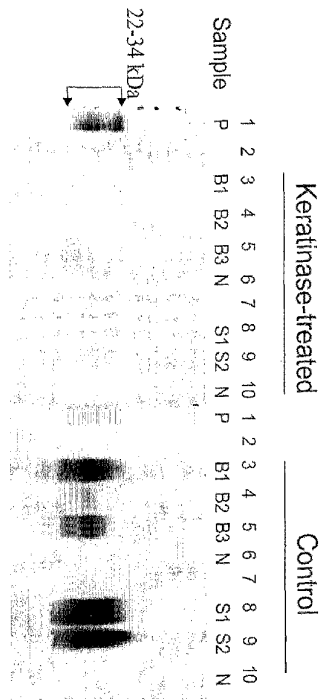


Figure 2

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/083082 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/08982
- (22) International Filing Date: 22 March 2002 (22.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
09/834,284 12 April 2001 (12.04.2001) US  
10/007,613 26 October 2001 (26.10.2001) US
- (71) Applicant: BIORESOURCE INTERNATIONAL, INC.  
[US/US], 840 Main Campus Drive, Suite 3560, Raleigh,  
NC 27606 (US).
- (72) Inventor: SHIH, Jason, C., H.; 100 Planters Wood Lane,  
Cary, NC 27511 (US).
- (74) Agent: HULTQUIST, Steven, J.; Intellectual Prop-  
erty/Technology Law, P.O. Box 14329, Research Triangle  
Park, NC 27709 (US).
- (81) Designated States (*national*): AI, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR,  
GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,  
MZ, NA, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE,  
SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GI, GM,  
KL, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:  
17 July 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/083082 A3

(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR DESTRUCTION OF INFECTIOUS PRION PROTEINS

(57) Abstract: 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-contaminated articles, such as surgical instruments, kitchen utensils, laboratory tools, etc.

【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US02/03982																		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>																				
IPC(7) : C12Q1/00 US CL : 435/4 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>																				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/4, 31.																				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>																				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
Y --- A	MARSH et al. Physical and chemical properties of the transmissible mink encephalopathy agent. Journal of Virology, 1969, Vol. 3, No. 2, 176-180, especially page 178, column 2, paragraph 2.	1-11, 14, 17-37, 39-41, 43-51, 53-61 ----- 12, 13, 15, 16, 38, 42, 52																		
Y --- A	CHO H. I. Inactivation of the scrapie agent by prions. Canadian Journal of Comparative Medicine, 1983, Vol. 47, pages 494-496, see page 496 column 1.	1, 5, 11, 14, 17, 18, 19, 24, 25, 46, 47 ----- 2-4, 6-10, 12, 13, 15, 16, 20-23, 26-45, 47- 61																		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>"I"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"Y"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"&amp;"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	"I"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
* Special categories of cited documents:	"I"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																		
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family																		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																				
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 07 February 2003 (07.02.2003)	Date of mailing of the international search report 10 APR 2003																			
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Ulrike Winkler, Ph.D. Telephone No. 703-308-0196																			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/08982

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y --- A	SCHALLER et al. Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). Acta Neuropathology. November 1999, Vol. 98, No. 5, pages 437-43, especially page 438, column 2, lines 1-3.	1, 5, 11, 14, 17, 18, 19, 24, 25, 46, 47 ----- 2-4, 6-10, 12, 13, 15, 16, 20-23, 26-45, 47- 61
Y --- A	BOLTEN et al. Molecular characteristics of the major scrapie prion protein. Biochemistry. 1984, Vol. 23, pages 2598-5906.	1-11,14, 17-37, 39- 41, 43-51, 53-61 ----- 12, 13, 15, 16, 38, 42, 52
Y --- A	Hunter et al. Attempts to release the scrapie agent from tissue debris. Comparative Pathology. 1967, Vol. 77, pages 301-307, especially Table 5.	39-41, 43-51, 53-61 ----- 12, 13, 15, 16, 38, 42, 52
A	McKINLEY et al. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. Cell. November 1983, Vol. 35, pages 57-62, especially page 60, column 2, paragraph 2.	1-61
A	WHO Infection control guidelines for transmissible spongiform encephalopathies. World Health Organization. March 1999, pages 1-38, see especially section 6.	1-61
A, P	Rutala et al. Creutzfeldt-Jakob disease: Recommendations for disinfection and sterilization. Clinical Infectious Diseases. 1 May 2001, Vol. 32, pages 1348-1356.	1-61
A	US 5,171,682 (SHIH et al) 15.December 1992 (15.12.1992) see table 4.	1-61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/08982

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
WEST, DERWENT, STN, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE  
prion, enzyme, digestion, degradation, infectivity, sterilization, cleaning, removal.

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM, HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,R O,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 シー , ジェーソン , シー . , エイチ .

アメリカ合衆国 , ノースカロライナ州 27511 , カリー , プランターズ ウッド レーン 1  
00

Fターム(参考) 4H003 DA05 DA12 DA17 DA20 EC03 ED02 FA34

专利名称(译)	用于破坏感染性朊病毒蛋白的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004531604A</a>	公开(公告)日	2004-10-14
申请号	JP2002580887	申请日	2002-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	百瑞国际公司		
申请(专利权)人(译)	生物资源国际机场公司		
[标]发明人	シー・ジェーソン・シー・エイチ		
发明人	シー, ジェーソン, シー., エイチ.		
IPC分类号	G01N33/53 A61L2/00 A61L2/04 A61L2/16 C11D3/386 C11D7/42		
CPC分类号	A61L2/0023 A61L2/0082 A61L2/04 A61L2/16		
FI分类号	C11D7/42 C11D3/386 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4H003/DA05 4H003/DA12 4H003/DA17 4H003/DA20 4H003/EC03 4H003/ED02 4H003/FA34		
代理人(译)	田中 克郎		
优先权	09/834284 2001-04-12 US 10/007613 2001-10-26 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

使用朊病毒的破坏的蛋白酶通过热/酶处理，传染性海绵状脑病（TSE），和/或用于与介导的疾病破坏感染性朊病毒蛋白其他朊病毒蛋白的方法和组合物感染性朊病毒蛋白。方法和组合物可含有感染性朊病毒蛋白菌株，或由感染性朊病毒蛋白应变污染组织的处理，或外科器械，厨房用具，朊病毒污染物品，例如实验室器皿的消毒或灭菌申请你可以。

特表2004-5311  
(P2004-53160)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004. 10. 14)

(5) Int. Cl. <sup>7</sup>		F I	テーマコード (参考)
C 11 D 7/42		C 11 D 7/42	4 H 0 0 3
C 11 D 3/386		C 11 D 3/386	
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 69 頁)	
(2) 出願番号 特願2002-580887 (P2002-580887)	(71) 出願人 503373997
(86) (22) 出願日 平成14年3月22日(2002. 3. 22)	バイオリソース インターショナル, イ
(85) 翻訳文提出日 平成15年10月10日(2003. 10. 10)	コーポレイテッド
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/008982	アメリカ合衆国, ノースカロライナ州
(87) 国際公開番号 W02002/083082	7 6 0 6, ラレイ, スイート 3 5 6 0
(87) 国際公開日 平成14年10月24日(2002. 10. 24)	メイン キャンパス ドライブ 8 4 0
(31) 優先権主張番号 09/834, 284	(74) 代理人 100079108
(32) 優先日 平成13年4月12日(2001. 4. 12)	弁理士 稲葉 良幸
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(74) 代理人 100080953
(31) 優先権主張番号 10/007, 613	弁理士 田中 克郎
(32) 優先日 平成13年10月26日(2001. 10. 26)	(74) 代理人 100083861
(33) 優先権主張国 米国 (US)	弁理士 大貫 真司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 感染性プリオン蛋白を破壊するための組成物および方法