

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 471**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3499 (2006.01)

A23L 3/3508 (2006.01)

A23L 3/3571 (2006.01)

A01N 37/16 (2006.01)

A61L 2/16 (2006.01)

A61L 2/18 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C11D 3/39 (2006.01)

C11D 3/48 (2006.01)

C11D 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2007** **E 07867290 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015** **EP 2089065**

54 Título: **Método para la descontaminación de priones**

30 Prioridad:

27.10.2006 US 854831 P

19.04.2007 US 925177 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.04.2015

73 Titular/es:

E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY

(100.0%)

1007 MARKET STREET

WILMINGTON, DE 19898, US

72 Inventor/es:

CROUD, VINCENT BRIAN;

JACKSON, GRAHAM y

COLLINGE, JOHN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 534 471 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la descontaminación de priones

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos y reactivos para ser usados en la descontaminación de priones. En particular, la invención se refiere a la descontaminación de priones de instrumentos quirúrgicos, evitando ventajosamente un tratamiento con autoclave.

Antecedentes de la invención

10 La persistencia y resistencia de los agentes de priones responsables de CJD (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob) ha hecho surgir temores sobre la posibilidad de una transmisión iatrogénica a continuación de una cirugía. Las enfermedades de priones, que incluyen tembladera, tembladera atípica en ovejas, BSE (Encefalopatía Espongiforme Bovina) en ganado, CWD (Enfermedad de Wasting Crónica) en ciervos y CJD en seres humanos son un grupo nuevo de estados neurodegenerativos mortales, transmisibles. El agente transmisible denominado príon está comprendido ampliamente o únicamente por un isómero conformacional de una proteína de príon PrP^C celular normal. El conformero relacionado con la enfermedad, denominado PrP^{Sc}, tiene varias propiedades inusuales que 15 incluyen resistencia a proteólisis, insolubilidad en detergentes y elevada estabilidad térmica. Estas propiedades físicas asociadas a observaciones de que PrP^{Sc} se adhiere fuertemente al acero quirúrgico y otros materiales presentan problemas en la limpieza y esterilización de instrumentos quirúrgicos ya que la actividad de priones se conoce que es resistente al tratamiento convencional en autoclave.

20 En ausencia de un ensayo de diagnóstico pre-clínico para la CJD, no es posible un ensayo pre-quirúrgico de los pacientes. Aunque en una minoría de casos, en los que la CJD se sospecha o es confirmada, los instrumentos usados pueden ser sometidos a cuarentena o destruidos. Sin embargo, para la mayoría de los procedimientos, son necesarios nuevos métodos de descontaminación. Hay muchos esfuerzos en marcha, que incluyen los del Departamento de Sanidad del Reino Unido (por ejemplo, Medical Research Council (MRC), Prion Unit, Londres, Reino Unido), intentando abordar el problema de las transmisiones iatrogénicas de la CJD.

25 En tratamiento en autoclave estándar y, en algunos casos, el tratamiento en autoclave a temperaturas elevadas hasta 134°C, es el patrón hospitalario para la descontaminación de priones. Sin embargo, estudios convencionales han mostrado la supervivencia de priones bajo condiciones de autoclave (Taylor, DM., J. Hosp. Infect 43:S69-S76 (1999); Jackson et al., J. Gen. Virol 86:869-878 (2005)). Claramente, los priones se acumularán gradualmente bajo estas condiciones. Incluso el autoclave más eficaz sólo esterilizará hasta el grado en que el calor y el vapor de agua 30 penetren en los artículos que están siendo tratados. Esto no es adecuado cuando se manejan conjuntos quirúrgicos que comprenden numerosos instrumentos complejos.

35 Taylor (Taylor D.M., *supra*) describe el uso de soluciones de hipoclorito de sodio e hidróxido de sodio 2M en la inactivación de priones. Sin embargo, hay problemas con esta propuesta como una inactivación incompleta y una incompatibilidad con muchos dispositivos médicos. Además, se ha informado la resistencia de los priones al tratamiento en autoclave.

40 Las normas de la entidad WHO (Organización Mundial de la Salud) sobre la descontaminación de priones recomendaron tratamiento en autoclave y sumergir los instrumentos contaminados en NaOH 1M y 20.000 ppm de NaOCl (Informe de la WHO "Infection Control Guidelines for Transmissible Spongiform Encephalopathies", 23-26 de marzo de 1999, Ginebra, Suiza, WHO/CDS/CSR/APH/2000.3). Esto es un procedimiento extremadamente peligroso y puede dejar residuos de sales no deseables sobre las superficies. Aparte de esto, además de los aspectos de seguridad, el efecto corrosivo de estas especies de halógenos alcalinas u oxidantes a esa concentración, combinado con las temperaturas y presiones propias del tratamiento en autoclave, probablemente destruirían o al menos 45 deteriorarían los delicados instrumentos quirúrgicos.

Los reactivos en el comercio actualmente en uso para la limpieza de instrumentos quirúrgicos antes del tratamiento en autoclave tienen poco a ningún efecto sobre la contaminación de PrP^{Sc}. Los métodos existentes de descontaminación como los que implican LpH® y LpH®sa (Steris, Inc. Mentor, OH), y Endozyme Plus (Ruhof Corp., Mineola, NY) son de uso limitado en destruir ineficazmente. Además, algunos reactivos son incompatibles con materiales médicos como el polímero Dracom (polisulfona).

50 Fichet et al. (Lancet 364:521-526 (2004)) describen tres métodos para la desinfección de dispositivos médicos contaminados con priones. En primer lugar describen el uso de un limpiador enzimático (KLENZYME®, Merk & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ) con tratamiento en autoclave a 121°C. En segundo lugar, describen un limpiador alcalino (HAMO® 100 PID, Steris, Mentor, Ohio). El tercer método descrito es el único que se dice que es adecuado para dispositivos frágiles como endoscopios e implica el uso de un limpiador alcalino sobre los instrumentos húmedos seguido de un tratamiento con peróxido de hidrógeno vaporizado (VHP) seco. Fichet *et al.* describen 55 también un limpiador enzimático seguido de tratamiento VHP como muy eficaz. No hay ninguna descripción de la composición del limpiador enzimático. El ácido peracético es usado y se muestra que es ineficaz (velocidad de transmisión de 100% a continuación del tratamiento).

La presente invención busca superar el (los) problema(s) asociado(s) con las composiciones y métodos asociados con la técnica anterior proporcionando composiciones y métodos eficaces de descontaminación de priones.

Sumario de la invención

- 5 Se proporciona una composición acuosa de degradación de priones para ser usada en el método de la reivindicación 1.
- Una composición acuosa de degradación de priones comprende (a) una cantidad eficaz de al menos un agente oxidante; (b) una cantidad eficaz de al menos una primera proteasa; (c) una cantidad eficaz de al menos una segunda proteasa en que dicha segunda proteasa es diferente de dicha al menos una primera proteasa; y (d) una cantidad eficaz de un tensioactivo.
- 10 En una realización preferida, la composición acuosa de degradación de priones comprende dos proteasas seleccionadas entre el grupo que consiste en NEUTRASE®, ALCALASE®, PRONASE® y Proteinasa K. En una realización preferida adicional, las dos proteasas son NEUTRASE® y ALCALASE®.
- En una realización preferida, el tensioactivo es dodecil-sulfato de sodio (SDS).
- 15 En otra realización, la composición acuosa de degradación de priones comprende adicionalmente un ingrediente adicional seleccionado entre el grupo que consiste en ajustadores del pH, agentes tamponantes, agentes quelantes, inhibidores de la corrosión, estabilizadores de peróxido y sus mezclas.
- La presente invención proporciona métodos mediante los cuales entidades con priones como instrumentos médicos pueden ser descontaminadas de la ineficacia de los priones. Según los métodos de esta invención, la entidad descontaminada de priones se pone en contacto con los compuestos de la composición acuosa de degradación de priones de forma secuencial.
- 20 Se ha encontrado sorprendentemente que los métodos de la invención dan lugar a una potenciación de la actividad de los componentes de la composición de degradación de priones, dando lugar a mejoras en la descontaminación de priones. En particular, el uso del agente oxidante en combinación con la proteasa descrita con posterioridad da lugar a un efecto sinérgico.
- 25 Se proporciona un método para la descontaminación o desinfección de priones que comprende: (a) poner en contacto una entidad contaminada con priones con al menos un tensioactivo; (b) poner en contacto la entidad con un agente oxidante y (c) poner en contacto la entidad con al menos una proteasa.
- Se proporciona un método secuencial para la descontaminación o desinfección de priones de una entidad contaminada con priones que comprende: (a) en primer lugar poner en contacto la entidad que va a ser descontaminada con un tensioactivo y seguidamente (b) poner en contacto la entidad que va a ser descontaminada con un agente oxidante, en que dicho agente oxidante comprende una fuente de peróxido y un activador y seguidamente (c) poner en contacto la entidad con una proteasa.
- 30 En otra realización, un método para la descontaminación o desinfección de priones de una entidad contaminada con priones comprende: (a) en primer lugar poner en contacto la entidad con un tensioactivo y seguidamente (b) poner en contacto la entidad con un agente oxidante y seguidamente (c) poner en contacto la entidad con una primera proteasa y (d) poner en contacto la entidad con una segunda proteasa.
- 35 En una realización preferida, las dos proteasas se seleccionan entre el grupo que consiste en NEUTRASE®, ALCALASE®, PRONASE® y Proteinasa K. En una realización preferida adicional, las dos proteasas son NEUTRASE® y ALCALASE®.
- 40 La entidad contaminada con priones puede tener una superficie sólida o ser un fluido, como un fluido biológico. Las superficies sólidas incluyen instrumentos médicos y dentales. En un aspecto, la entidad contaminada con priones se selecciona entre el grupo que consiste en un residuo biológico, una instalación usada en instalaciones de tratamiento de alimentos, un recinto usado para albergar animales, un instrumento médico, un instrumento dental y encimeras. El tratamiento de alimentos incluye, por ejemplo, instalaciones de mataderos y de tratamiento de aves de corral. En una realización preferida, la entidad contaminada con priones se selecciona entre el grupo que consiste en instrumentos médicos contaminados con priones. En otro aspecto preferido, el instrumento médico es un endoscopio o laparoscopia. Todavía en otro aspecto, el instrumento médico está comprendido por acero, plástico o una combinación de los mismos. El instrumento médico puede estar comprendido también por otros materiales de construcción que se encuentran normalmente en dispositivos e instrumentos médicos.
- 45 En otro aspecto, los métodos de degradación de priones son usados para disminuir y/o eliminar la CJD iatrogénica.
- En un aspecto preferido, los métodos para la descontaminación de priones se realizan en un esterilizador de instrumentos médicos.
- En otro aspecto, cualquiera de los métodos de la presente invención comprende adicionalmente y tiene

preferentemente una etapa final, de tratamiento en autoclave de la entidad contaminada con priones.

En un aspecto preferido, el presente método se usa para una descontaminación a bajas temperaturas en las que se evita el tratamiento en autoclave.

- 5 Se proporciona un estuche de ensayo que comprende: (a) un primer reactivo que comprende un agente oxidante; (b) un segundo reactivo que comprende al menos una proteasa y (c) un tercer reactivo que comprende un tensioactivo.

El segundo reactivo en el estuche de ensayo comprende al menos dos proteasas diferentes. En una realización preferida, las dos proteasas se seleccionan entre el grupo que consiste en NEUTRASE®, ALCALASE®, PRONASE® y Proteinasa K. En una realización preferida adicional, las dos proteasas son NEUTRASE® y ALCALASE®.

- 10 En otra realización preferida, el primero, segundo y tercer reactivos se proporcionan individualmente en forma de sólidos. En una realización preferida, el primero, segundo y tercer reactivos en el estuche de ensayo se proporcionan en forma de polvos sólidos.

- 15 En otra realización, el estuche de ensayo comprende adicionalmente un reactivo adicional seleccionado entre el grupo que consiste en ajustes del pH, agentes tamponantes, agentes quelantes, inhibidores de la corrosión, estabilizadores de peróxido y sus mezclas, que pueden ser suministrados como reactivo adicional del estuche de ensayo o pueden estar incluidos como un reactivo en uno o más primero, segundo y tercer reactivo.

Breve descripción de las figuras

- 20 Figuras 1a y 1b. Análisis por transferencia Western de los datos generados en el ejemplo 2 que muestran la eficacia no detectable de PERASAFE® Sterilant para la descontaminación de priones (Figura 1a) en comparación con el tratamiento combinado con PERASAFE® Sterilant y proteasas y SDS (Figura 1b), en el que se exhibió una descontaminación.

- 25 Figura 2. Transferencia Western de los datos generados en el ejemplo 4 que muestran la eficacia de descontaminación usando concentraciones optimizadas de enzimas para la degradación proteolítica de PrP^{Sc} conjuntamente con un agente oxidante (PERASAFE® Sterilant) a 40°C. La columna de marcador es indicada como M; la columna de testigo, C, contiene 12 µl de un homogenato de cerebro al 10% p/v como testigo. En seis columnas, identificadas mediante tiempos de incubación, se introdujeron 12 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v tratados a 40°C durante 2, 10, 20, 30, 40 y 60 minutos.

- 30 Figura 3. Un gráfico del ensayo celular de tembladera (el ensayo de cultivo celular descrito en el ejemplo 5). Varias diluciones de homogenato de cerebro de los animales infectados con cepas RML (Rocky Mountain Laboratories) de priones son aplicados como revestimiento sobre alambres. Los alambres son sometidos al tratamiento de descontaminación. Se ensayaron tratamientos a 40°C y 50°C. Se representaron gráficamente diversas diluciones (RML) frente al número de unidades infecciosas de cultivo de tejidos (TC IU).

- 35 Figura 4. Una transferencia Western de los datos generados en el ejemplo 6 que muestran la eficacia de descontaminación usando concentraciones optimizadas de enzimas para la degradación proteolítica PrP^{Sc} usando diversas concentraciones de SDS en ausencia del agente oxidante (PERASAFE® Sterilant) a 50°C. La columna de marcador es indicada como M. La columna de testigo, C, contiene 12 µl de un homogenato de cerebro al 10% p/v como testigo. En las columnas se introdujeron 12 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v tratado con SDS al 0, 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0% (p/v). Las columnas se identifican mediante la concentración de SDS.

- 40 Figura 5. Una transferencia Western de los datos generados en el ejemplo comparativo A que muestra la eficacia de descontaminación usando diversas concentraciones de ALCALASE® para la degradación proteolítica de PrP^{Sc} en ausencia de un agente oxidante (PERASAFE® Sterilant) a 50°C. La columna de marcador es indicada como M. La columna de testigo, C, contiene 17 µl de un homogenato de cerebro al 10% p/v como testigo. En las columnas se introdujeron 17 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v tratado con diversas concentraciones de ALCALASE® e identificadas mediante concentraciones de ALCALASE® de 1,5, 1,25, 1,0, 0,75, 0,50, 0,25 y 0 mg/ml.

- 45 Figura 6. Una transferencia Western de los datos generados en el ejemplo comparativo B que muestra la eficacia de descontaminación usando diversas concentraciones de NEUTRASE® para la degradación proteolítica de PrP^{Sc} en ausencia de un agente oxidante (PERASAFE® Sterilant) a 50°C. La columna de marcador es indicada como M. La columna de testigo, C, contiene 17 µl de un homogenato de cerebro al 10% p/v como testigo. En las columnas se introdujeron 17 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v tratado con diversas concentraciones de NEUTRASE® e identificadas mediante las concentraciones de NEUTRASE® de 1,5, 1,25, 1,0, 0,75, 0,50, 0,25 y 0 mg/ml.

- 50 Figura 7. Una transferencia Western de los datos generados en el ejemplo 7 que muestra la eficacia de la descontaminación usando diversas concentraciones de ALCALASE®/NEUTRASE® (basadas en una dilución de varias veces a partir de los ejemplos anteriores; diluciones de 2, 4, 8, 16, 32 y 64 de alimentos) para la degradación proteolítica de PrP^{Sc} en presencia de un agente oxidante (PERASAFE® Sterilant) a 50°C. La columna de marcador es indicada como M. La columna de testigo, C, contiene 12 µl de un homogenato de cerebro al 10% p/v como

testigo. En las columnas indicadas como 64, 32, 16, 8, 4 y 2 se introdujeron 12 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v y las diluciones respectivas de ALCALASE®/NEUTRASE®. Por ejemplo, la columna indicada como 2 es una dilución de 2 veces de las concentraciones estándar de ALCALASE®/NEUTRASE® (es decir, 1,58 mg/ml de ALCALASE® y 6,32 mg/ml de NEUTRASE®).

Figura 8. Una transferencia Western de los datos generados en el ejemplo 8 que muestra la eficacia de descontaminación usando diversas concentraciones de ALCALASE®/NEUTRASE® (basadas en diluciones de varias veces de 4, 6,7, 8,3, 10 y 12,5). Cada columna es identificada mediante el factor de dilución, mostrado como marcas de las columnas, para la degradación proteolítica de PrP^{Sc} en presencia de un agente oxidante (PERASAFE® Sterilant) a 50°C. La columna de marcador es indicada como M. La columna de testigo, C, contiene 12 µl de un homogenato de cerebro al 10% p/v como testigo. En las columnas indicadas como 4, 6,7, 8,3, 10 y 12,5 se introdujeron 12 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v y las diluciones respectivas de ALCALASE®/NEUTRASE®.

Figura 9. Una transferencia Western de los datos generados en el ejemplo comparativo C que muestra la eficacia de descontaminación usando componentes de formulación PERASAFE® Sterilant en combinación con SDS al 1% p/v, 750 µg/ml de ALCALASE® y 3 µg/ml de NEUTRASE® a 50°C. La columna de marcador es indicada como M. La columna de testigo, C, contiene 16 µl de un homogenato de cerebro al 10% p/v como testigo. En las columnas marcadas (a) a (f) se introdujeron 16 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v y los respectivos componentes se identifican en el ejemplo comparativo C.

Figura 10. Una transferencia Western de los datos generados en el ejemplo 9 que muestra la eficacia de descontaminación usando diversas concentraciones de ALCALASE®/NEUTRASE® (basadas en diluciones de varias veces de 4, 6,7, 8,3, 10 y 12,5). Cada columna es identificada mediante el factor de dilución, mostrando como marcas de las columnas, para la degradación proteolítica de PrP^{Sc} en presencia de un agente oxidante (PERASAFE® Sterilant) a 50°C. Esto es una repetición del trabajo original realizado en el ejemplo 8 (Figura 8). La columna de marcador es indicada como M. La columna de testigo, C, contiene 12 µl de un homogenato de cerebro al 10% p/v como testigo. En las columnas indicadas como 4, 6,7, 8,3, 10 y 12,5 se introdujeron 12 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v y las diluciones respectivas de ALCALASE®/NEUTRASE®.

Figura 11. Una transferencia Western de los datos generados en el ejemplo 10 que muestra la eficacia de descontaminación usando diversos componentes de PERASAFE® Sterilant o diluciones de PERASAFE® Sterilant completo con relación a la formulación 1X estándar en combinación con SDS al 1% p/v, 330 µg/ml de ALCALASE® y 1,2 mg/ml de NEUTRASE® a 50°C. La columna de marcador es indicada como M. La columna de testigo, C, contiene 13 ml de un homogenato de cerebro al 10% p/v como testigo. En las columnas indicadas como (a) a (e) se introdujeron 13 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v y los respectivos componentes son como se indicó en el ejemplo 10.

Figura 12. Transferencia Western de los datos generados en el ejemplo 11 que muestra la eficacia de PERASAFE® Sterilant 1X + SDS al 1% p/v + ALCALASE® + NEUTRASE® para la descontaminación de priones a 40°C frente a 50°C. La columna de testigo, C, contiene 12 µl de un homogenato de cerebro al 10% p/v como testigo. En las columnas 2, 5, 10 y 20 a cada temperatura indican los tiempos de reacción. En estas columnas se introdujeron 12 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v tratado a las temperaturas y tiempos indicados.

Figura 13. Comparación gráfica de las cinéticas de degradación de PrP a 40°C y 50°C a partir de la transferencia Western de la Figura 12 y los datos generados en el ejemplo 11. Los datos se describen mejor mediante una caída exponencial doble debido a las dos especies principales de PrP presentes; PrP^C y PrP^{Sc}. Los valores de K_{1/2} son muy similares para 40°C y 50°C (29 segundos y 22 segundos, respectivamente).

Figura 14. Transferencia Western de los datos generados en el ejemplo 12 comparando la eficacia de otros agentes oxidantes cuando se usan en combinación con SDS al 1% p/v y 300 µg/ml de ALCALASE® + 1,2 mg/ml de NEUTRASE®. La columna de testigo, C, contiene 12 µl de un homogenato de cerebro al 10% p/v como testigo. En las columnas marcadas como "A", "B", "C", "H", "N", "P" y "V" se introdujeron 12 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v tratado como se describe. C = Testigo, A = 16,2 mg/ml de PERASAFE® Sterilant (1X), B y C = 13 mg/ml de PERASAFE® Sterilant (0,8X), H = una dilución 1:70 de hipoclorito (pH 8), N = 3,34 mg/ml de NaDCC (Neochlor), P = 30 mg/ml de PROXITANE® (pH 6,5) y V = 20 mg/ml de desinfectante VIRKON® S (pH 6).

Figura 15. Una representación gráfica de los niveles de inmunorreactividad mostrados en la figura 14 basados en los datos generados en el ejemplo 12. Las columnas mostradas en la figura 14 fueron cuantificadas mediante densitometría y son expresadas a continuación mediante un porcentaje del valor del testigo.

Descripción detallada de la invención

A invención proporciona un método de descontaminación de priones.

En esta descripción, se usa un cierto número de términos y abreviaturas. Las siguientes definiciones son aplicadas salvo que se establezca específicamente otra cosa.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “que comprende” significa la presencia de las características citadas, números enteros, etapas o componentes como se citan en las reivindicaciones, pero no excluye la presencia o adición de una o más de otras características, números enteros, etapas, componentes o sus grupos.

- 5 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “aproximadamente” modificando la cantidad de un ingrediente o reactivo de la invención o empleado en referencia a la variación de una cantidad numérica que se produzca, por ejemplo, a través de una medición típica y procedimientos de manejo de líquidos usados para preparar concentrados o soluciones de uso en el mundo real; a través de un error inadvertido en estos procedimientos; a través de diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes empleados para preparar las composiciones o llevar a cabo los métodos; y similares. El término “aproximadamente” abarca también 10 cantidades que difieren debido a diferentes condiciones de equilibrio para una composición que resulta de una mezcla inicial particular. Cuando no se modifiquen mediante el término “aproximadamente”, las reivindicaciones incluyen equivalentes a las cantidades. En una realización adicional, “aproximadamente” significa el valor de referencia en un 10%, preferentemente en un 5% y lo más preferentemente en un 1%.
- 15 Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “prión” y “partículas de priones” se refieren a un agente proteináceo causante de enfermedades responsable de un cierto número de enfermedades cerebrales degenerativas en animales y seres humanos. Ejemplos de enfermedades asociadas a priones incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (todas las formas que incluyen CJD, iCJD (iatrogénica), vCJD (variante), sCJD (esporádica) y familiar (fCJD)), síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Insomnio Familiar Mortal y Kuru.
- 20 Ejemplos de enfermedades asociadas a priones en animales incluyen, pero sin limitación, tembladera, tembladera atípica en ovejas, BSE (Encefalopatía Esponjiforme Bovina) en ganado y CWD (Enfermedad de Wasting Crónica) en ciervos.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “superficie contaminada con priones” se refiere a una superficie contaminada (o potencialmente contaminada) con una partícula de prión infecciosa.

- 25 Como se usa en la presente memoria descriptiva, “cantidad eficaz” se usa para describir la cantidad de una sustancia particular o combinación de sustancias en una formulación descrita en la presente memoria descriptiva para conseguir una disminución en el título de partículas de priones infecciosas.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “perácido” es sinónimo de peroxiácido, ácido peroxycarboxílico, ácido peroxídico, ácido peroxycarboxílico y ácido peróxicoico.

- 30 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “ácido peracético” se abrevia como “PAA” y es sinónima de ácido peroxiacético, ácido etanoperoxoico y otros sinónimos del número de registro CAS 79-21-0 y se incluirán las formas tanto protonadas como no protonadas (es decir, iones peracetilo).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “perhidrólisis” se define como la reacción de un sustrato seleccionado (un “activador”) con peróxido para formar un perácido. Normalmente, el peróxido inorgánico se hace reaccionar con el activador para producir el perácido. En una realización, el perácido es ácido peracético.

- 35 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “contaminantes biológicos” se refiere a una o más entidades biológicas no deseadas y/o patógenas que incluyen, pero sin limitación, microorganismos, esporas, virus, priones y sus mezclas. La presente invención es particularmente eficaz en la destrucción y/o degradación de priones.

- 40 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “desinfecta” se refiere al procedimiento de destrucción o prevención del crecimiento de contaminantes biológicos. Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “desinfectante” se refiere a una composición que desinfecta destruyendo, neutralizando o inhibiendo el crecimiento de contaminantes biológicos. Normalmente, los desinfectantes se usan para tratar objetos inanimados o superficies.

- 45 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “descontamina” significa proporcionar seguridad eliminando sustancias perjudiciales (por ejemplo, partículas de priones).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, las expresiones “fuente peroxigenada”, “fuente de peróxígeno” y “fuente de oxígeno” se refieren a compuestos capaces de proporcionar una cantidad eficaz de peróxido de hidrógeno que incluyen, pero sin limitación, peróxido de hidrógeno, aductos de peróxido de hidrógeno (por ejemplo, aducto urea-peróxido de hidrógeno (peróxido de carbamida)), perboratos y percarbonatos. En una realización preferida, la fuente de peróxígeno es perborato de sodio.

- 50

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “sistema de agentes oxidantes” se refiere a un sistema (por ejemplo, una composición o formulación) que proporciona una cantidad eficaz de un agente oxidante. En una realización, el sistema de agentes oxidantes comprende una fuente de peróxígeno y un activador de perácidos que (cuando se mezclan bajo condiciones de reacción acuosa adecuada) genera una cantidad eficaz de perácido, preferentemente ácido peracético.

- 55

Composición acuosa de degradación de priones

La presente invención se refiere a composiciones para ser usadas en la descontaminación de priones de entidades contaminadas con priones. En un aspecto, la invención proporciona una composición de degradación de priones que comprende un agente oxidante, una o más proteasas y un tensioactivo como un tensioactivo/detergente iónico.

5 Agente oxidante

El agente oxidante puede ser cualquier entidad química o mezcla capaz de oxidar (o catalizar la oxidación) de proteínas, preferentemente proteína(s) de priones.

10 El agente oxidante puede ser cualquiera de los que se conoce que son eficaces en formulaciones con eficacia biocida. El agente oxidante se puede seleccionar entre el grupo que consiste en un peróxido, persal, perácidos, persulfatos, peroxifalatos, cloros orgánicos, dióxido de cloro y sus mezclas estables. Ejemplos incluyen hipoclorito de sodio, perborato de sodio, percarbonato de sodio, peróxido de hidrógeno, ácido peracético, dióxido de cloro, peroximonopersulfato de potasio, dicloroisocianurato de sodio, ácido triclorocianúrico y sus mezclas estables.

15 En una realización el agente oxidante se proporciona en forma de un líquido o un sólido disuelto en un disolvente polar (por ejemplo, agua). Una vez disuelto, el agente oxidante proporciona una concentración adecuada de especies activas de agente oxidante en la composición de degradación de priones. "Agente activo oxidante" se refiere a las especies oxidantes totales según se determina mediante titulación de oxígeno AVOX/yodométrica disponible, u otro método adecuado (método tiosulfatimétrico, método permanganométrico o método cerimétrico), es decir, el poder oxidante (véase las publicaciones "Peroxide Chemistry", Waldemar Adam, Editor, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2001 y "Organic Peroxides", Daniel Swern, Editor, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ, 20 1971). En el método yodométrico, el poder oxidante de los productos se mide convenientemente en términos de la cantidad de yodo liberado mediante reacción con yoduro de potasio (determinado mediante una titulación posterior de ese yodo). El procedimiento es estándar en la técnica y los resultados pueden ser expresados en términos de hipohalito disponible, perácido o halógeno, o de oxígeno, o simplemente como "poder oxidante".

25 Los agentes oxidantes preferidos son los que tienen una buena eficacia a bajas temperaturas y buena compatibilidad con materiales.

En una realización preferida, el agente oxidante comprende peróxido, un peróxido modificado, un perácido como ácido peracético o sus mezclas. Éste puede ser una mezcla en equilibrio de ácido peracético, peróxido de hidrógeno y ácido acético o ser generado *in situ* a partir de una fuente apropiada de peroxígeno y un "activador". Ejemplos de activadores (o precursores de perácidos) incluyen, pero sin limitación, tetraacetil-etilenodiamina (TAED), 30 nonanoiloxibenceno-sulfonato (NOBS), nonanoiloxi-sulfonato de sodio (SNOBS), nonil-amido-caproil-oxibenceno-sulfonato (NACA-OBS), ésteres de ácidos carboxílicos, triacetina, diacetina, ácido acético, tetracetil-glicol-urilo (TAGU), óxido de diacetil-hexahidrotiazina, N-acil-lactamas, acetil-trietil-citrato (ACT), pentaacetato de glucosa, octaacetato de sacarosa y ácido acetil-salicílico, por mencionar algunos. En una realización preferida, el activador es un donante de N-acilo como TAED, SNOBS, TAGU, N-acil-lactamas. En un aspecto preferido adicional, el activador es TAED.

35 Se reconocerá que el ácido peracético y el peróxido existirán en formas tanto protonadas como desprotonadas, dependiendo la relación del pH y pKa de las especies relevantes. Ejemplos de desinfectantes basados en perácidos disponibles en el comercio incluyen, pero sin limitación, PERASAFE® Sterilant y RelyOn® Disinfectant. PERASAFE® Sterilant es una combinación en polvo de una fuente de oxígeno (40-60% p de perborato de sodio y 40 10-30% p de tetraacetil-etileno-diamina), estabilizador, inhibidor de la corrosión, tampón y desinfectante, que cuando se mezcla con agua, genera un sistema de agente oxidante que comprende aproximadamente 0,26% de ácido peracético (en forma de un mezcla de ácido peracético e iones peracetilo) a pH 8,0, cuando se prepara según las instrucciones del fabricante.

45 El agente oxidante es un sistema de peroxígeno. Un sistema de peroxígeno es una combinación de una fuente de peroxígeno (por ejemplo, una persal como perborato de sodio o percarbonato de sodio) y un activador como tetraacetil-etilenodiamina (TAED) o L-acetil-caprolactama, u otro activador como se cita con anterioridad, que genera ácido peracético y aniones peracéticos *in situ* tras la disolución. Preferentemente, el sistema de peroxígeno es usado en fase líquida, preferentemente en solución, preferentemente en solución acuosa.

50 En un aspecto, el agente oxidante comprende al menos un perácido alifático de C1 a C10. En un aspecto preferido, el agente oxidante comprende iones peracetilo ($\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OO}^-$) y/o ácido peracético ($\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OOH}$; CAS 79-21-0). Preferentemente el agente oxidante comprende peróxido de hidrógeno y/o ácido peracético, más preferentemente el agente oxidante comprende peróxido de hidrógeno, ácido peracético e iones peracetilo. Un agente oxidante preferido es PERASAFE® Sterilant suministrado por la entidad Antec International, Sudbury, Reino Unido (una sucursal de E.I. DuPont de Nemours and Company, Inc., Wilmington, DE, USA). En una realización particular, 55 PERASAFE® Sterilant es formulado para una solución de almacenamiento que varía de 0,1X a 20X de PERASAFE® Sterilant, preferentemente de 0,5X a 5X de PERASAFE® Sterilant, más preferentemente 0,5X a 2X de PERASAFE® Sterilant. En caso de conflicto, preferentemente PERASAFE® Sterilant es formulado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, es decir, 81 g/ 5 litros para una solución madre de PERASAFE® Sterilant 1X.

La cantidad de agente oxidante en la composición acuosa de degradación de priones es una cantidad eficaz, es decir, una cantidad que, cuando se usa en la composición con los otros componentes, es eficaz para la degradación de priones. Preferentemente, cuando el agente oxidante es ácido peracético, es usado a una concentración equivalente a 0,26% p/v de ácido peracético (0,26% surge del uso de PERSAFE® Sterilant a 16,2 g/l de forma que un 0,1% permanece 24 horas después de la constitución). Se ha descubierto sorprendentemente que hay una sinergia entre el agente oxidante y la proteasa (enzima de degradación de priones) usada en la presente invención. Por tanto, el uso reducido de agente oxidante puede ser compensado mediante un uso aumentado de enzima y viceversa. Las cantidades exactas de agente oxidante y proteasa se pueden determinar mediante las condiciones en uso, consideraciones de costes y el grado de eficacia requerida. Estas cantidades pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica.

Preferentemente, el agente oxidante es usado a pH neutro. En una realización, el intervalo de pH es de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, preferentemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 y lo más preferentemente de aproximadamente 8 por razones de compatibilidad de materiales.

Opcionalmente, es incluido también peróxido de hidrógeno en la composición oxidante además de otro agente oxidante. Preferentemente, el peróxido de hidrógeno está en solución, más preferentemente en solución acuosa.

Opcionalmente, es incluido también ácido acético en la composición oxidante.

Proteasas

La composición acuosa de degradación de priones comprende al menos una proteasa que, cuando se combina con el agente oxidante, está presente en una cantidad eficaz para la degradación de priones.

Las proteasas o petidasas (usadas de forma intercambiable) son enzimas que escinden las uniones de amidas en sustratos de proteínas (véase Walsh, *Enzymatic Reaction Mechanisms*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, Chapter 3 (1979) y Rao et al., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3):597-635 (1998)). Las proteasas incluyen cualquier enzima perteneciente al grupo de enzimas EC 3.4, según se define por la entidad Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Estas enzimas pueden ser subdividas de forma amplia en dos categorías principales, exopeptidasas y endopeptidasas, dependiendo de su sitio de acción.

Como las proteasas son ubicuas para todos los organismos vivos, las proteasas adecuadas para la degradación de priones para ser usadas en la composición de esta invención pueden ser aisladas a partir de una diversidad de organismos eucarióticos y/o procarióticos. Las proteasas útiles en el comercio han sido aisladas a partir de plantas (por ejemplo, papaína, bromelaína y queratinasas), animales (por ejemplo, tripsina, pepsina y renina) y microbios como hongos (por ejemplo, proteasas de *Aspergillus oryzae*) y bacterias (especialmente proteasas bien conocidas aisladas a partir del género *Bacillus*). Las especies de *Bacillus* secretan dos tipos extracelulares de proteasas, proteasas neutras (muchas de las cuales son metalo-enzoproteasas, como NEUTRASE®, normalmente activa en un intervalo de pH general de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, véase el documento US 6.636.526) y proteasas alcalinas (como ALCALASE®, normalmente caracterizada por una actividad elevada a pH alcalino, véase GENBANK® P00780 y P00782, Van der Osten et al., *J. Biotechnol.*, 28:55-68 (1993)).

Un subgrupo de las proteasas de serina provisionalmente denominadas subtilasas ha sido propuesto por Siezen, et al., supra. Estas proteasas de serina son útiles en la composición, método y estuche de ensayo de esta invención. Se definen mediante análisis de homología de más de 40 secuencias de aminoácidos de serina proteasas previamente denominadas proteasas de tipo subtilisina. Una subtilisina fue previamente definida como una serina proteasa producida mediante bacterias Gram-positivas u hongos y según Siezen, et al., y es actualmente un subgrupo de las subtilasas (o "subtilisina proteasas"). Se ha identificado una amplia diversidad de subtilisinas y ha sido determinada la secuencia de aminoácidos de un cierto número de subtilisinas. Éstas incluyen más de seis subtilisinas de cepas de *Bacillus*, a saber, subtilisina 168, subtilisina BPN', subtilisina Carlsberg, subtilisina Y, *subfilina amilosacchariticus* y mesentericopeptidasa (Kurihara et al., *J. Biol. Chem.* 247 5629-5631 (1972); Wells et al., *Nucleic Acids Res.* 11 7911-7925 (1983); Stahl and Ferrari, *J. Bacteriol.* 159 811-819 (1984), Jacobs, et al., *Nucl. Acids Res.* 13 8913-8926 (1985); Nedkov et al., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366 421-430 (1985), Svendsen, et al., *FEBS Lett.* 196 228-232 (1986)), una subtilisina de una actinomicetales, termitasa de *Thermoactinomyces vulgaris* (Meloun et al., *FEBS Lett.* 198 195-200 (1985)), y una subtilisina fúngica, Proteinasa K de *Tritirachium album* (Jany and Mayer, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366 584-492 (1985)). Para una referencia adicional, véase la tabla I de Siezen et al., supra.

Las subtilisinas están bien caracterizadas física y químicamente. Además del conocimiento de la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de estas enzimas, se determinaron más de 50 estructuras por rayos X de resolución elevada de subtilisinas que delinean la unión del sustrato, estado de transición, productos, al menos tres inhibidores de proteasas diferentes y definen las consecuencias estructurales para una variación natural (Kraut, *Ann. Rev. Biochem.* 46 331-358 (1977)).

Un subgrupo de subtilasas particularmente útiles para esta invención, I-S1, comprende las subtilisinas "clásicas", como subtilisina 168, subtilisina BPN', subtilisina Carlsberg (por ejemplo ALCALASE®, disponible en la empresa Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) y subtilisina DY.

Un subgrupo adicional de las subtilisinas I-S2 es reconocido por Siezen et al. (supra). Las proteasas del subgrupo I-S2 son también proteasas útiles en esta invención y se describen como subtilisinas altamente alcalinas y comprenden enzimas como subtilisina PB92 (por ejemplo, MAXACAL®, Gist-Brocades NV, Dinamarca), subtilisina 309 (por ejemplo, SAVINASE®, Novozymes) y subtilina 147 (por ejemplo, ESPERASE®, Novozymes) y elastasa alcalina YaB.

Las mutaciones al azar y dirigidas al sitio del gen de la subtilasa han surgido a partir del conocimiento de las propiedades físicas y químicas de la enzima y contribuyeron a una información relativa a la actividad catalítica de la subtilasa, especificidad de sustrato, estructura terciaria, etc. (Wells, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:1219-1223 (1987); Wells, et al., Phil. Trans. R. Soc. Lond.A. 317:415-423 (1986); Hwang and Warshel, Biochem. 26 2669-2673 (1987); Rao, et al., Nature 328:551-554 (1987); Carter, et al., Proteins 6:240-248 (1989); Graycar, et al., Annals of the New York Academy of Sciences 672 71-79 (1992); and Takagi, Int. J. Biochem. 25 307-312 (1993)).

Ejemplos de proteasas y variantes de proteasas que son útiles en esta invención han sido descritos en numerosas patentes y solicitudes de patentes de los Estados Unidos que incluyen, pero sin limitación, las publicaciones de solicitudes de patentes de EE.UU. US 200502391885 A1 y US 20060147499 A1 y las patentes de EE.UU. concedidas: US 5.500.364, US 6.506.589, US 6.555.355, US 6.558.938, US 6.558.939, US 6.605.458, US 6.632.646, US 6.682.924, US 6.773.907, US 6.777.218, US 6.780.629, US 6.808.913, US 6.835.821, US 6.893.855, US 6.921.657, US 7.026.53, US 7.098.017 y US 7.109.016.

Ejemplos de proteasas disponibles en el comercio incluyen, pero sin limitación, el grupo consistente en *Bacillus* sp. (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, etc.), proteasas como subtilisinas (ALCALASE®, disponible en la empresa Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), la proteasa neutra NEUTRASE® (disponible en la empresa Novozymes), EVERLASE® (Novozymes; una proteasa de *Bacillus* sp. Disponible en la empresa Sigma-Aldrich, catálogo n° P5985), POLARZYME® (Novozymes; una proteasa tratada por ingeniería genética a partir de aplicaciones de lavados a bajas temperaturas), SAVINASE® (disponible en la empresa Novozymes), *Sus scrofa* pepsin, *Carica papaya* chymopapain, *Ananas comosus* bromelain, *Carica papaya* papain, *Streptomyces griseus* PRONASE® (también conocida como PRONASE E® o PRONASE®), *Tritirachium album* Proteinasa K (que incluye Proteinasa K producida de forma recombinante a partir de *Pichia pastoris*), y sus mezclas. Estas proteasas son enzimas disponibles en el comercio y pueden estar disponibles en una diversidad de formas de productos que incluyen polvos, comprimidos y formulaciones líquidas. En otro aspecto la(s) enzima(s) disponible(s) en el comercio puede(n) ser opcionalmente purificada(s) o parcialmente purificada(s) antes de ser usada(s) en los presentes métodos. Los métodos para purificar proteínas son bien conocidos en la técnica. En una realización preferida, la proteasa se selecciona entre el grupo que consiste en Proteinasa K, PRONASE®, ALCALASE®, NEUTRASE®, y sus mezclas.

En un aspecto, la composición usada en los métodos de esta invención comprende una combinación de dos o más proteasas. Preferentemente, cuando están presentes dos o más proteasas en la composición, las proteasas se seleccionan entre el grupo que consiste en PRONASE®, Proteinasa K, ALCALASE® y NEUTRASE®.

En una realización preferida, la proteasa es una combinación de Proteinasa K y PRONASE®, ALCALASE® y NEUTRASE® o ALCALASE® y PRONASE®. Cuando la composición comprende dos o más proteasas, las proteasas pueden ser usadas de forma secuencial o simultánea en una mezcla para proteólisis. Sin embargo, debe apreciarse que cuando se pone en contacto una entidad contaminada con priones con varias proteasas a la vez, las actividades individuales pueden ser reducidas y puede ser necesaria una compensación, por ejemplo, mediante un tiempo de contacto más prolongado. Esto se expone más en detalle con posterioridad.

Como es obvio para un experto en la técnica, cuanto mayor sea la concentración de la(s) proteasa(s), mayor y más rápida es la destrucción que se consigue. Las combinaciones de la concentración de proteasas y el tiempo pueden ser escogidas según las necesidades. Éstas pueden ser optimizadas mediante ensayos y errores rutinarios.

Las proteasas son susceptibles a una manipulación o modificación genética y/o de nivel de péptidos o productos químicos. Será evidente para un experto en la técnica que las truncaciones, mutaciones o adaptación de las proteasas (por ejemplo, para hacerlas más resistentes a las propias proteasas) no interfieren con la invención con la condición de que la actividad de peptidasa de la(s) enzima(s) sea retenida mediante esta(s) manipulación(es). De hecho, es aceptado que PRONASE® está más en la naturaleza de una preparación de proteasas fraccionadas más que una enzima purificada de forma recombinante y el uso de un producto de sub-fraccionamiento de PRONASE® de una fracción clonada y purificada de forma recombinante de la(s) peptidasa(s) comprendida por PRONASE® está abarcada por la presente invención. Las proteasas termoestables son particularmente preferidas, si son obtenidas mediante modificación de proteasas existentes o bien clonando proteasas a partir de organismos termofílicos.

En general, la proteasa total añadida a la composición de la invención es de aproximadamente 1,6 g/l (1,6 mg/ml). Sin embargo, la cantidad eficaz de proteasa puede variar y variará, por ejemplo, desde menos de 0,1 hasta más de 20 g/l, dependiendo de la cantidad de agente oxidante presente. Los intervalos típicos son de 0,1 a 5 g/l o desde 1 a 4 g/l. Se añadirán más proteasas si está presente menos agente oxidante e inversamente, se puede usar menos proteasa en una composición eficaz si está presente más agente oxidante.

Tensioactivo/detergente

La composición de degradación de priones usada en el método de la presente invención comprende un tensioactivo. Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos "tensioactivo" y "detergente" se usarán de forma intercambiable e incluyen tensioactivos de iones híbridos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos y tensioactivos no iónicos. Ejemplos de tensioactivos incluyen, pero sin limitación, los tensioactivos aniónicos, como dodecil-sulfato de sodio (SDS), lauril-sulfato de amonio y otras sales de alquil-sulfato, monohidrato de 1-octanosulfonato de sodio, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, lauril-sulfato de sodio, lauril-éter-sulfato de sodio (SLES), hidrato de taurodesoxicolato de sodio y alquil-benceno-sulfonato; tensioactivos catiónicos como bromuro de cetil-trimetilamonio y otras sales de alquil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio, sebo-aminapolietoxilada, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio; tensioactivos de iones híbridos (anfóteros) como dodecil-betaína, óxido de dodecil-dimetilamina, cocamidopropilbetaína y coco-anfo-glicinato; y tensioactivos no iónicos como alquil-poli(óxido de etileno), copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno), alquil-poliglucósidos (por ejemplo, acetil-glucósido), decil-maltósido, alcoholes grasos, alcohol cetílico, alcohol oleílico, cocamido-monoetanolamina, cocamido-dietanolamina y cocamido-trietanolamina).

En una realización particular, el tensioactivo se selecciona entre el grupo que consiste en dodecilbenceno-sulfonato de sodio, lauril-éter-sulfato, condensado de óxido de etileno/óxido de propileno/alquil-fenol, poliglicol-éter o alcoholes grasos, condensado de ácido graso-óxido de etileno, poliglicol-éter de alquil-fenoles, etoxilato de alcohol graso, lauril-éter-sulfato de sodio, dodecil-sulfato de sodio y combinaciones de dos o más de los mismos.

En otra realización particular, el tensioactivo es un tensioactivo catiónico o aniónico, preferentemente un tensioactivo aniónico y, más preferentemente, dodecil-sulfato de sodio (SDS), hidrato de taurodesoxicolato de sodio, monohidrato de 1-octanosulfonato de sodio, dodecil-sulfato de litio, sal de sodio de N-lauroilsarcosina o una combinación de dos o más de los mismos. Preferentemente, el tensioactivo es SDS.

El tensioactivo puede ser usado a cualquier concentración eficaz. Ésta se puede determinar fácilmente y/o ser optimizada mediante ensayo y error rutinario. Cuando el tensioactivo es SDS, la concentración final del tensioactivo con respecto al contacto con una entidad contaminada con priones con un tensioactivo es preferentemente de aproximadamente 1% (porcentaje en peso) a aproximadamente 6%, más preferentemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 3%, incluso más preferentemente de aproximadamente 1% y los más preferentemente 1%, basada en la optimización de la transferencia Western. Nuevamente, hay una sinergia entre las enzimas, tensioactivo y agente oxidante y los niveles de componentes pueden ser variados para ajustarse a las necesidades.

Las proteasas pueden estar adversamente afectadas (por ejemplo, adolecer de actividad reducida o pérdida de actividad) en presencia de tensioactivo en exceso. Las proteasas individuales tienen características individuales y está dentro de las capacidades de un experto en la técnica evitar la pérdida de actividad debida a la acción del tensioactivo. Deben ser seguidas las instrucciones del fabricante cuando sea posible. Ventajosamente, el (o los) nivel(es) de tensioactivos está(n) limitado(s) con el fin de no inhibir significativamente la actividad de las proteasas para la degradación de priones con anterioridad y en el momento del contacto con la proteasa.

Componentes adicionales

En una realización preferida, la composición de degradación de priones comprende al menos un inhibidor de la corrosión. Aunque el inhibidor de la corrosión puede que no contribuya a la eficacia de la composición de degradación de priones, se prefiere el uso de al menos un inhibidor de la corrosión, especialmente cuando se descontaminan en instrumentos delicados. Ejemplos de inhibidores de la corrosión se describen en el documento US 5.077.008 y normalmente incluyen pero sin limitación, triazoles (por ejemplo, benzotriazol), azoles, fosfatos y benzoatos. En una realización el inhibidor de la corrosión es benzotriazol o tolil-triazol. En una realización preferida, el inhibidor de la corrosión es benzotriazol.

En otra realización preferida, la composición de degradación de priones comprende al menos un estabilizador de peroxígeno. Los estabilizadores de peroxígeno son conocidos, véase, por ejemplo, el documento US 5.624.634. Ejemplos de estabilizadores de peroxígeno adecuados para ser usados en la composición de esta invención incluyen estabilizadores de peróxido de hidrógeno y estabilizadores de perácidos. Estos estabilizadores incluyen, pero sin limitación, amino-tri(ácido metileno-fosfónico) (serie DEQUEST® 2000), ácido 1-hidroxietilideno-1,1-difosfónico (HEDP; serie DEQUEST® 2010), ácido hexametileno-diamino-tetrametileno-fosfónico (serie DEQUEST® 2050), ácido hexametileno-triamino-pentametileno-fosfónico (serie DEQUEST® 2090, dietileno-triamino-pentametileno-fosfonato (serie DEQUEST® 2060), ácido etileno-diamino-tetrametileno-fosfónico (DEQUEST® 2041), ácido dipicolínico, ácidos fosfónicos y sus sales. Los estabilizadores DEQUEST están disponibles en la empresa Solutia, Inc., St. Louis, MO. En una realización preferida, el estabilizador de peroxígeno es ácido etileno-diamino-tetrametileno-fosfónico (DEQUEST® 2041) o ácido 1-hidroxietilideno-1,1-difosfónico (HEDP; DEQUEST® 2010) y/o sus sales.

Realizaciones preferidas

En una realización preferida, la composición de degradación de priones comprende al menos dos proteasas y el tensioactivo es dodecil-sulfato de sodio. En una realización preferida adicional, las dos proteasas se seleccionan

entre el grupo que consiste en PRONASE®, ALCALASE®, NEUTRASE® y Proteinasa K y el tensioactivo es dodecil-sulfato de sodio. Más preferentemente, la composición de degradación de priones comprende dos proteasas y las dos proteasas son NEUTRASE® y ALCALASE®. Preferentemente, el agente oxidante de la composición de degradación de priones comprende ácido peracético a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 y, por tanto, consiste en las formas tanto protonadas como desprotonadas.

Método para descontaminar la entidad infectada con priones

La presente invención proporciona un método secuencial para descontaminar una entidad contaminada con priones que comprende poner en contacto la entidad contaminada con (a) una cantidad eficaz de al menos un agente oxidante, (b) una cantidad eficaz de al menos una proteasa y (c) una cantidad eficaz de al menos un tensioactivo. La etapa de contacto se realiza durante un periodo de tiempo suficiente para degradar las partículas de priones. Los agentes oxidantes preferidos, proteasas, tensioactivos y sus cantidades para ser usados en los métodos de esta invención son como se describieron con anterioridad.

El método comprende opcionalmente la etapa de tratar en autoclave la entidad después del contacto con la composición de degradaciones de priones. El protocolo para el uso de la composición de degradación de priones es compatible con el hardware existente como las máquinas usadas para el prelavado de instrumentos médicos antes del tratamiento en autoclave.

En una realización, se usan etapas de al menos un agente oxidante y al menos dos proteasas en combinación con un tensioactivo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método como se describió anteriormente en el que la primera proteasa es NEUTRASE® y la segunda proteasa es ALCALASE®.

Contacto simultáneo/secuencial

Las etapas de contacto del método de esta invención se realizan de forma secuencial.

Cuando se usa más de una proteasa, las proteasas pueden ser combinadas en una etapa única. Sin embargo, la actividad de las proteasas puede ser rebajada en esta realización debido a que cada proteasa digiere a la otra. Todavía, las etapas individuales en los métodos de la presente invención se llevan a cabo de forma secuencial. Las etapas de los métodos de esta invención pueden ser repetidas y cualquiera de los métodos puede comprender adicionalmente etapas de lavado para separar la composición de degradación de priones, por ejemplo, a partir de una superficie sólida.

El método de esta invención comprende (a) poner en contacto en primer lugar la entidad contaminada con priones con un tensioactivo y seguidamente (b) poner en contacto la entidad con un agente oxidante y seguidamente (c) poner en contacto la entidad con al menos una proteasa.

En otra realización, un método secuencial para la descontaminación o desinfección de priones de una entidad contaminada con priones comprende: (a) poner en contacto en primer lugar la entidad con un tensioactivo y seguidamente (b) poner en contacto la entidad con un agente oxidante y seguidamente (c) poner en contacto la entidad con una primera proteasa, y (d) poner en contacto la entidad con una segunda proteasa. Cuando se pone en contacto la entidad contaminada con priones con dos proteasas, puede ser ventajoso separar la totalidad o una parte de la primera proteasa antes de que la entidad se ponga en contacto con la segunda proteasa. En una realización, sustancialmente la totalidad de la primera proteasa es separada antes del contacto con la segunda proteasa. Esto se aplica igualmente a cada etapa de proteasa en una secuencia de etapas múltiples.

Es deseable separar la etapa de aplicación de tensioactivo de la(s) etapa(s) de aplicación de proteasa(s) si el tensioactivo afecta adversamente a la actividad de la proteasa. En esta realización, al menos una proporción del tensioactivo es separado (o diluido) antes de que la entidad se ponga en contacto con una proteasa con el fin de maximizar la actividad de la proteasa.

El tiempo de reacción o incubación para cada etapa será normalmente de menos de 24 horas, preferentemente menos de 2 horas, más preferentemente menos de 1 hora y lo más preferentemente menos de 20 minutos.

Tratamiento en autoclave

En un aspecto de la invención, el método de esta invención comprende adicionalmente el tratamiento en autoclave de la entidad.

El tratamiento en autoclave, si se emplea como se describe en la presente memoria descriptiva, se puede llevar a cabo usando cualquier ciclo adecuado en autoclave. Los ciclos típicos incluyen 121°C durante 18 minutos o, preferentemente, 134°C durante 18 minutos. Pueden ser escogidos ciclos alternativos por el operario para adaptarse a las necesidades particulares. Pueden ser empleados ventajosamente ciclos prolongados en autoclave. El tratamiento en autoclave en agua puede mejorar los efectos destructores de priones y, por lo tanto, es preferido cuando se usa el tratamiento en autoclave.

Ventajosamente, se realiza una etapa de tratamiento en autoclave como una etapa final en los métodos de la presente invención, es decir, el tratamiento en autoclave se realiza después de la(s) etapa(s) de contacto. Una etapa de tratamiento en autoclave proporciona las ventajas de minimizar la extensión de la infección a través de la entidad contaminada con priones y es particularmente ventajosa cuando la entidad es un instrumento quirúrgico. Además, combinando la(s) etapa(s) de contacto con el tratamiento en autoclave de esta manera, puede haber ventajosamente un aumento multiplicativo de la eficacia, es decir, si cada método puede reducir el título infeccioso en 5 unidades logarítmicas, entonces se combinan para reducir la infecciosidad incluso más, como en 10 unidades logarítmicas.

Preferentemente, se evita o se realiza el tratamiento en autoclave durante un tiempo reducido como menos de 3 horas, preferentemente el tratamiento en autoclave se omite; especialmente para instrumentos médicos frágiles.

Temperatura

La composición de degradación de priones y sus componentes individuales, como en un método de tratamiento secuencial, se puede poner en contacto con la entidad contaminada con priones en un intervalo de temperaturas. En una realización la(s) etapa(s) de contacto está(n) a una temperatura en el intervalo de 15°C a aproximadamente 80°C, preferentemente de aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C, más preferentemente de aproximadamente 40°C a aproximadamente 60°C y, lo más preferentemente, de aproximadamente 45°C a aproximadamente 55°C.

Como el contacto del tensioactivo se realiza en una etapa separada que no incluye una proteasa, el tensioactivo se puede poner en contacto con la entidad contaminada con priones a cualquier temperatura adecuada. De hecho, puede ser usada una temperatura elevada. Una etapa separada para el contacto del tensioactivo con la entidad es flexible y se realiza preferentemente a una temperatura de al menos 70°C, preferentemente al menos 80°C, preferentemente al menos 90°C, preferentemente al menos 100°C.

La temperatura puede estar restringida por la naturaleza de la entidad, por ejemplo, algunas instalaciones médicas como los endoscopios no pueden tolerar temperaturas elevadas como las usadas en el tratamiento en autoclave. Para estas situaciones, los métodos de la invención ventajosamente no implican las condiciones de autoclave y la elección de la temperatura se debe hacer por el operario con respecto a las tolerancias de la entidad que está siendo descontaminada. Ejemplos de métodos según la presente invención que evitan el uso de las condiciones de autoclave se pueden encontrar en la sección de ejemplos. Ventajosamente, los métodos según la presente invención como los de los ejemplos pueden sustituir tratamientos convencionales de la técnica anterior como LpH®, LpH®se, y tratamiento EndozymePlus. Véase la publicación de la solicitud de patente de EE.UU n° 2006/0217282 A1.

El tiempo de reacción o el tiempo de incubación para cada etapa será normalmente de menos de 24 horas, preferentemente menos de 2 horas, más preferentemente menos de 1 hora y, lo más preferentemente, menos de 20 minutos.

Las temperaturas de incubación, es decir, las temperaturas a las que la(s) proteasa(s) se pone(n) en contacto con la entidad variarán según la proteasa usada. Generalmente, es aceptable cualquier temperatura desde temperatura ambiente (por ejemplo, 15-20°C) hasta aproximadamente 80°C, siendo más preferida de aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C, es incluso más preferida de aproximadamente 40°C a aproximadamente 60°C y la más preferida de aproximadamente 45°C a aproximadamente 55°C. A medida que la temperatura se aparta del calor óptimo para una proteasa particular, tarda más tiempo la desactivación de los contaminantes de priones. Claramente, esto puede estar compensado mediante una incubación durante un tiempo más prolongado o usando una mayor concentración de proteasa. A temperaturas por encima de 60°C las actividades pueden ser inferiores y las enzimas pueden resultar inactivadas, pero claramente las preparaciones de proteasas individuales tendrán temperaturas de desactivación individuales y deben ser seguidas las normas del fabricante siempre que sea posible.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "baja temperatura" significa menos de 134°C, preferentemente menos de 121°C, más preferentemente menos 100°C, incluso más preferentemente menos de 90°C, incluso más preferentemente menos de 80°C, incluso más preferentemente menos de 70°C, todavía incluso más preferentemente menos de 60°C y, lo más preferentemente, significa una temperatura como de aproximadamente 35°C a aproximadamente 60°C.

Características del método

Preferentemente, la(s) etapa(s) de contacto se lleva(n) a cabo con agitación. Preferentemente, dicha agitación es una agitación rotatoria, por ejemplo, a aproximadamente 750 rpm.

Los ejemplos presentados en la presente memoria descriptiva incluyen las condiciones óptimas de uso en máquinas lavadoras automáticas. Además, las condiciones escogidas son ventajosamente de bajo coste.

Ventajosamente, cuando la entidad contaminada con priones es un instrumento médico, los métodos para la descontaminación de priones se realizan en un esterilizador de instrumentos médicos.

Entidad contaminada con priones

La entidad contaminada con priones puede ser cualquier objeto físico en el que se desee desactivar y/o suprimir priones. El término abarca fluidos así como sólidos (objetos), como dispositivos o instrumentos médicos (incluidos instrumentos quirúrgicos). Los fluidos incluyen fluidos biológicos. Los priones que van a ser desactivados o suprimidos pueden estar en la entidad (por ejemplo, en solución o suspensión en un fluido) o pueden estar sobre la entidad (por ejemplo, unidos, enlazados o asociados de alguna otra manera con la superficie de una entidad sólida). Por tanto, la entidad puede tener una superficie. Entidades que tienen superficie incluyen, por ejemplo, un instrumento médico, un instrumento de laboratorio, una superficie de un recinto esterilizado, una encimera o la superficie de una zona o instalación usada para la preparación o tratamiento de alimentos o la superficie de un recinto usado para albergar animales. La superficie puede comprender metal, plástico o cualquier otro material relevante de construcción. El metal puede ser acero como acero quirúrgico.

Cuando la entidad contaminada con priones es una superficie sólida, puede ser también encimeras de laboratorio, instrumentos de laboratorio o una instalación de laboratorio, por ejemplo, en un recinto esterilizado para investigación, producción y ensayo de compuestos farmacéuticos y biológicos.

Ejemplos no limitativos de entidades que pueden estar contaminadas con priones y que pueden ser ventajosa y eficazmente descontaminadas según los métodos de esta invención, incluyen superficies de instalaciones quirúrgicas de complejos veterinarios u hospitalarios así como superficies que entran en contacto con dicha instalación quirúrgica. Preferentemente, la entidad es un instrumento médico que incluye instrumentos frágiles como un laparoscopia o endoscopia.

La entidad puede ser usada en la industria de tratamiento de alimentos. Por tanto, la entidad contaminada con priones se puede seleccionar entre el grupo que consiste en depósitos, transportadores, suelos, desagües, refrigeradores, congeladores, superficies de instalaciones, paredes, válvulas, cintas, conductos, alcantarillas, conexiones, grietas y combinaciones de dos o más de los mismos. La entidad contaminada con priones se puede seleccionar entre una superficie de un granero o establo para ganado como aves de corral, ganado bovino, vacas lecheras, cabras, caballos y cerdos; y/o criaderos para aves de corral y gambas.

La superficie diana se puede poner en contacto con las presentes composiciones de descontaminación de priones usando cualquier número de medios. El tiempo, temperatura y concentración eficaz usados cuando se pone en contacto el lugar deseado se pueden determinar fácilmente por un experto en la técnica. Los métodos específicos de contacto incluyen pulverización, tratamiento, inmersión, remojo, vertido, mezcla, combinación, pintado, revestimiento, aplicación, fijación y cualquier otro que comunique la(s) presente(s) composición(es) de contaminación de priones con la superficie que va a ser tratada, es decir, que conoce o sospecha que está siendo contaminada con partículas de priones.

Descontaminación

La descontaminación se refiere a la reducción del título de priones en una muestra o complejo específico. La descontaminación se puede referir a la supresión de priones de una superficie tanto si dichos priones son desactivados como si no. Por tanto, la descontaminación incluye la desactivación e incluye también la eliminación de priones independientemente de que sean o no destruidos/desactivados. Cuando se descontamina, es importante que la infecciosidad de los priones se suprima de la superficie o solución que está siendo descontaminada. Esto puede ser mediante destrucción /desactivación) o mediante simple separación. Por tanto, los métodos de esta invención pueden comprender adicionalmente, después de poner en contacto la entidad contaminada con priones con (a) una cantidad eficaz de al menos un agente oxidante, (b) una cantidad eficaz de al menos una proteasa y (c) una cantidad eficaz de al menos un tensioactivo, separando la entidad tratada de los reactivos de tratamiento. El aspecto importante es que los priones (es decir, PrP^{Sc}) ya no están asociados con la superficie o solución que está siendo descontaminada o se reducen en número y/o título. Claramente, si permanecen priones no infecciosos o fragmentos adheridos a la superficie tratada después de la descontaminación, esto no afectaría materialmente a la descontaminación o al hecho de que la superficie haya sido satisfactoriamente descontaminada.

En un aspecto de esta invención, las composiciones de degradación de priones y los métodos son usados para disminuir y/o eliminar la CJD iatrogénica.

La descontaminación puede ser valorada mediante cualquier ensayo adecuado. Preferentemente, el ensayo usado es una transferencia Western o un bioensayo. Claramente, los ensayos como los bioensayos y/o ensayos de transferencia Western tienen un límite de sensibilidad. En la medida en que se haya reducido el título de priones (número/infecciosidad de priones), entonces se considerará que ha tenido lugar la descontaminación de priones.

Preferentemente, la descontaminación de priones es de 100 veces, preferentemente 1.000 veces, preferentemente 10.000 veces, preferentemente 100.000 veces, preferentemente 1.000.000 veces o incluso más. Preferentemente, los priones son completamente eliminados o desactivados.

La desinfección se refiere a la limpieza en la medida en que destruya o prevenga el crecimiento de microorganismos patógenos además de la descontaminación asociada con la infecciosidad de priones. La desinfección se produce

mediante la acción combinada de una cantidad eficaz de agente oxidante (por ejemplo, ácido peracético), una cantidad eficaz de la(s) proteasa(s) y una cantidad eficaz del tensioactivo.

Métodos de ensayo

5 La reducción en priones producida mediante los métodos de la presente invención puede ser verificada mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Ejemplos específicos de técnicas de ensayo adecuadas se proporcionan en la presente memoria descriptiva para ilustrar la valoración de la reducción de priones.

10 Claramente, ciertos métodos se presentarán como más adecuados para una situación dada que otros métodos. Por ejemplo, si la descontaminación de priones está teniendo lugar en solución, entonces la propuesta de una transferencia Western puede ser la más adecuada. Si la descontaminación de priones está teniendo lugar en una superficie, entonces la visualización directa de esa superficie puede ser lo más adecuado. Alternativamente, para una descontaminación de priones que tiene lugar en una superficie, un bioensayo puede ser lo más adecuado. La elección de los métodos de ensayo individuales para situaciones individuales está dentro de las capacidades de un experto en la técnica. Se apreciará que en muchas situaciones el indicador más importante es la pérdida/reducción de infecciosidad. Actualmente, la infecciosidad de priones es valorada lo más habitualmente mediante un bioensayo. Sin embargo, es igualmente apropiado el ensayo bioquímico de PrP^{Sc} conformero infeccioso.

15 Un ejemplo de un método de verificación adecuado es un ensayo de inmunotransferencia. Ventajosamente, el ensayo de inmunotransferencia consiste o está basado en el ensayo descrito por Wadsworth et al. (Lancet 358:171-180 (2011)).

20 Un ejemplo de un método de verificación adecuado es un bioensayo. Los métodos de bioensayo están generalmente orientados a las especies de priones individuales que estén siendo ensayadas. La selección de métodos de bioensayo adecuados se basan ventajosamente en las especies de priones que están siendo ensayadas.

Estuches de ensayo

25 Se describen también estuches de ensayo para ser usados en la descontaminación de entidades contaminadas con priones. En una realización, el estuche de ensayo comprende un conjunto de reactantes de los que un primer reactante comprende un agente oxidante, un segundo reactante comprende al menos una proteasa y un tercer reactante comprende un tensioactivo.

30 En una realización preferida, el segundo reactante comprende al menos dos proteasas. En una realización más preferida, la al menos una o las al menos dos proteasas se seleccionan entre el grupo que consiste en PRONASE®, Proteinasa K, ALCALASE® y NEUTRASE®. En una realización más preferida, el segundo reactante comprende al menos dos proteasas, en que las dos proteasas son ALCALASE® y NEUTRASE®.

35 En una realización adicional, el estuche de ensayo comprende uno o más reactantes adicionales en los que los reactantes adicionales se seleccionan entre el grupo que consiste en ajustadores del pH, agentes tamponantes, agentes quelantes, inhibidores de la corrosión, estabilizadores de peróxido y sus mezclas. Alternativamente, el primer, segundo o tercer reactante puede comprender adicionalmente uno o más de los reactantes adicionales.

40 En una realización adicional, cada uno de los reactantes en el estuche de ensayo es suministrado en forma sólida, preferentemente en forma de polvos, para favorecer la estabilidad en almacenamiento. Los reactantes del estuche de ensayo se mezclan con un disolvente polar hasta una concentración eficaz de cada uno de los reactantes. Una vez que se mezclan eficazmente en el disolvente polar, se proporciona una composición de descontaminación de priones lista para ser usada. El disolvente polar preferido es agua.

45 Los reactivos usados son agua soluble, estable y de baja toxicidad. El protocolo para su uso es compatible con el hardware existente, por ejemplo, como se usa en los departamentos de descontaminación de hospitales para prelavado y tratar en autoclave instrumentos. Por tanto, la invención proporciona la descontaminación de la infecciosidad de priones de instrumentos quirúrgicos. Ventajosamente, el método de la presente invención puede ser practicado usando la maquinaria existente.

La invención se ilustra seguidamente por medio de ejemplos que no deben ser considerados como limitación de su alcance. En particular, la(s) etapa(s) en los ejemplos en los que una entidad es tratada con tensioactivo a temperatura elevada no está(n) en relación con características esenciales de la invención, sino que es (son) meramente etapas opcionales ventajosas.

50 Ejemplos

Ejemplo comparativo 1. Tratamiento combinado de oxidación y proteasa

Este ejemplo describe métodos mediante los cuales una entidad contaminada con el material infeccioso PrP^{Sc} puede ser descontaminada y el material infeccioso desactivado en una suspensión acuosa mediante una exposición secuencial de la entidad (en el ejemplo, la entidad es un tejido cerebral infectado) a un agente oxidante más SDS

tensioactivo y dos enzimas proteolíticas (ALCALASE® y NEUTRASE®).

Preparación de muestras de tejidos

5 El cerebro de la corteza frontal humana infectada con CJD fue homogeneizado a 20% (p/v) en PBS Dulbecco GIBCOBRL 14190-094 (Paisley, Reino Unido), solución tamponante de fosfato, denominada en lo sucesivo "PBS", haciendo pasar el tejido cerebral a través de agujas de calibre 18, calibre 21 y calibre 23 para producir el "homogenato". El homogenato se diluyó hasta 15% p/v con PBS, se concentró en pequeñas partes alícuotas y se almacenó a -70°C.

Protocolo A: Uso de concentraciones de ALCALASE®/NEUTRASE® en presencia de PERASAFE® Sterilant

Cada reacción se realizó a un volumen total de 100 µl, que contenía 60 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v.

10 (a) Una muestra de homogenato de cerebro, 60 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v, se puso en contacto con 20 µl de agente oxidante 5X PERASAFE® Sterilant, preparado según las instrucciones del fabricante para una concentración de ácido peracético al 0,26% a pH 8,0 usando solución salina tamponada con fosfato (PBS) y 5 µl de SDS al 20% p/v. La mezcla de reacción resultante contenía PERASAFE® Sterilant y SDS al 1% p/v.

(b) La mezcla de reacción se incubó al 50°C durante 10 minutos y se analizaron 40 µl de la mezcla de reacción.

15 (c) Tratamiento con una primera proteasa: ALCALASE® (Novozymes). Se preparó una solución de 10 mg/ml de ALCALASE® en agua. Una parte alícuota de 3 µl de esta solución enzimática se añadió a la solución de 85 µl de homogenato tratado producido en la etapa (b) anterior. La concentración final de ALCALASE® fue de 300 µg/ml.

20 (e) Tratamiento con una segunda proteasa: NEUTRASE® (Novozymes). Se preparó una solución de 10 mg/ml de NEUTRASE® en agua. Se añadió una parte alícuota de 12 µl de esta solución enzimática a una solución de 88 µl de SDS/PERASAFE® Sterilant y homogenato tratado con ALCALASE® producido en la etapa (c) anterior. La concentración final de NEUTRASE® fue de 1,2 mg/ml. La mezcla se incubó a 50°C durante 10 minutos.

Detección PrP^{Sc} mediante transferencia Western

25 Los materiales del tratamiento con SDS/PERASAFE® Sterilant/ALCALASE®/NEUTRASE® (protocolo A) descritos anteriormente fueron sometidos a un análisis de transferencia Western. Las transferencias fueron visualizadas los anticuerpos ICSM 18 e ICSM 35 para detectar cualquier PrP^{Sc} restante en las muestras. Usando cualquier anticuerpo, no hubo PrP^{Sc} detectable. Para la información de anticuerpos y métodos de detección en los mismos, véanse los documentos EP934531 A1 y EP1565213. Todos los anticuerpos descritos en la presente memoria descriptiva se pueden encontrar haciendo referencia a la solicitud de patente (PCT) N° PCT/GB99/03617; patente británica N° GB 2.348.203; Patente Australiana N° AU 773763; Patente Sudafricana N° ZA 2001/3947; y documento 30 US 6.534.036.

35 Resulta claro a partir de este ejemplo que los métodos de la presente invención conducen a una descontaminación significativa de priones. Después del tratamiento según el protocolo A, con agente oxidante y dos proteasas, se observaron niveles elevados de destrucción de PrP a todas las concentraciones de proteasa como se manifestó mediante falta total de inmunorreactividad, que es equivalente a una reducción de al menos 1.200 veces de infecciosidad. Esta estimación está basada en un límite de detección previamente determinado para el protocolo de inmunotransferencia Western específico usado (Wadsworth et al., Lancet 358(9277): 171-180 (2001)) que es un método de ensayo preferido.

40 Usando este método de ensayo, se determinó que se pueden detectar fácilmente 12 µl de un homogenato de cerebro al 10% p/v en el testigo sin tratar. La sensibilidad de la inmunotransferencia Western para PrP es siempre de 10 nl de un homogenato al 10% p/v. Por tanto, si los 12 µl de homogenato al 10% p/v es la cantidad de partida en un experimento y no es detectable ninguna señal mediante transferencia Western, entonces ha habido una reducción mayor o igual a 1.200 veces en PrP.

Ejemplo comparativo 2. Comparación de descontaminación de priones usando PERASAFE®

Tratamiento esterilizante solamente y tratamiento de PERASAFE® Sterilant y proteasas en una etapa única

45 En este ejemplo, la descontaminación de priones se demostró según la presente invención mediante oxidación usando PERASAFE® Sterilant y tratamiento con proteasas (protocolo C), en comparación con un tratamiento ineficaz de la técnica anterior de PERASAFE® Sterilant solamente (protocolo B).

Protocolo B: Tratamiento solamente con PERASAFE® Sterilant (comparativo)

Se usó el siguiente protocolo para preparar muestras tratadas solamente con PERASAFE® Sterilant.

50 (a) Se preparó una solución madre de PERASAFE® Sterilant 5X, 1 ml, añadiendo 81 mg de polvo de PERASAFE® Sterilant a 1 ml de H₂O destilada y desionizada (dd) a 37°C. Se usó una mezcladura por torbellino para disolver el

polvo y la solución se incubó a 37°C durante 15 minutos.

(b) Se prepararon 300 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v de CJD y se sometieron a mezclado por torbellino para asegurar una suspensión uniforme centrifugando en un microcentrifugadora a un ajuste de velocidad mínima de 1(80x g) durante 1 minuto.

5 (c) Se separaron 200 µl de materia sobrenadante del homogenato de cerebro y se transfirieron a un tubo limpio que había sido calentado a 37°C. Se añadieron 65 µl de solución madre de PERASAFE® Sterilant 5X y se mezclaron con el homogenato mediante mezclado por torbellino.

(d) Se añadieron 65 µl de PBS a la mezcla producida en la etapa (c) mezclada por torbellino.

10 (e) Se separó una parte alícuota de 20 µl de mezcla de homogenato de la etapa (d) para un tubo separado que contenía 20 µl de tampón de carga SDS 2X y seguidamente el tubo separado se congeló a -70°C en aproximadamente 5 minutos.

(f) La mezcla restante de la etapa (d) se incubó a 37°C con agitación (750 rpm).

15 (g) Se separaron partes alícuotas adicionales de 20 µl de la mezcla producida en la etapa (d) en los tiempos de 5, 10, 30, 60 y 120 minutos para separar tubos que contenían cada uno 20 µl de tampón de carga SDS 2X. Cada parte alícuota se congeló a -70°C en aproximadamente 5 minutos.

(h) Todas las partes alícuotas se descongelaron simultáneamente en un bloque de calentamiento a 100°C. Se midió el tiempo mezclado por torbellino de las partes alícuotas cada dos minutos durante un total de 10 minutos y las partes alícuotas se centrifugaron a velocidad máxima en una microcentrifugadora (15.000 x g).

20 (i) Para cada muestra alícuota de 20 µl, la muestra se introdujo en un pocillo separado que contenía gel de acrilamida al 16% tamponado con tris-glicina. El gel se llevó a 200 voltios durante 80 minutos. Los 20 µl restantes de muestra se congelaron y se almacenaron a -70°C.

(j) Las muestras tratadas con gel de acrilamida de la etapa (i) se sometieron a un análisis de transferencia Western sobre una membrana de poli(fluoro de vinilideno) (PVDF) (Imobilon-P) durante 90 minutos a 40 voltios o a 15 voltios durante una noche (más de 12 horas).

25 (k) La membrana fue bloqueada en proteína láctea al 5% y PBS durante 45-60 minutos.

(l) Las muestras tratadas se incubaron con anticuerpo primario durante 1 hora, ICSM35B a 0,2 µg/ml en PBS. Se usó un volumen de 25 ml para una membrana única.

30 (m) Las transferencias se revelaron seguidamente según el sistema Storm® para gel y análisis de transferencia y un sistema de formación de imágenes de transferencia (tecnología del sistema Phosphorimager®, disponible en la empresa Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA), para la cuantificación.

Protocolo C: Degradación proteolítica con Proteinasa K y PRONASE® conjuntamente con oxidación con PERASAFE® Sterilant

Se usó el siguiente protocolo para preparar muestras tratadas con PERASAFE® Sterilant conjuntamente con Proteinasa K (PK) y proteasas PRONASE®.

35 (a) Se preparó una solución madre de PERASAFE® Sterilant de 5x, 1 ml, añadiendo 81 mg de polvo de PERASAFE® Sterilant a 1 ml de H₂O destilada y desionizada (dd) a 37°C. Se usó una mezclado por torbellino para disolver el polvo y la solución se incubó a 37°C durante 15 minutos.

40 (b) Se prepararon 300 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v de CJD y se sometieron a mezclado por torbellino para asegurar una suspensión uniforme centrifugando en una microcentrifugadora al ajuste de velocidad mínima de 1(80 x g) durante 1 minuto.

(c) Se separaron 200 µl de materia sobrenadante del homogenato de cerebro y se transfirieron a un tubo limpio, que había sido calentado a 37°C. Se añadieron 65 µl de solución madre de PERASAFE® Sterilant 5X y se mezclaron con el homogenato mediante mezclado por torbellino.

45 (d) Se añadieron 55 µl de una solución de SDS al 20% p/v en H₂O dd a la mezcla producida en la etapa (c) y la mezcla resultante se mezcló por torbellino.

(e) Se añadieron 10 µl de una solución de 10 mg/ml de PK en H₂O dd y 10 µl de una solución de 40 mg/ml de PRONASE® en H₂O dd a la mezcla producida en la etapa (d) y la mezcla resultante se mezcló por torbellino.

50 (f) Se retiró una parte alícuota de 20 µl de mezcla de homogenato de la etapa (e) para un tubo separado que contenía 20 µl de tampón de carga SDS 2X y seguidamente el tubo separado se congeló a -70°C en aproximadamente 5 minutos.

(g) La mezcla restante de la etapa (e) se incubó a 37°C con agitación (750 rpm).

(h) Se retiraron partes alícuotas adicionales de 20 µl de la mezcla producida en la etapa (e) en los tiempos de 5, 10, 30, 60 y 120 minutos para separar tubos que contenían cada uno 20 µl de tampón de carga SDS 2X. Cada parte alícuota se congeló a -70°C en aproximadamente 5 minutos.

5 (i) Todas las partes alícuotas se descongelaron simultáneamente en un bloque de calentamiento a 100°C. Se midió el tiempo la mezclado por torbellino de las partes alícuotas para cada dos minutos durante un total de 10 minutos y las partes alícuotas se centrifugaron a velocidad máxima en una microcentrifugadora (15.000 x g).

10 (j) Para cada muestra de parte alícuota de 20 µl, la muestra se introdujo en un pocillo separado que contenía gel de acrilamida al 16% tamponado con tris-glicina. El gel se llevó a 200 voltios durante 80 minutos. Los 20 µl restantes de la muestra se congelaron y se almacenaron a -70°C.

(k) Las muestras tratadas con acrilamida-gel de la etapa (j) se sometieron a un análisis por transferencia Western sobre membrana de poli(fluoro de vinilideno) (PVDF) (Imobilon-P) durante 90 minutos a 40 voltios o bien a 15 voltios durante una noche (más de 12 horas).

(l) La membrana fue bloqueada en proteína láctea al 5% y PBST durante 45-60 minutos.

15 (m) Las muestras tratadas fueron incubadas con anticuerpo primario durante 1 hora, ICSM35B a 0,2 µg/ml en PBST. Se usó un volumen de 25 ml para una membrana única.

(n) Las transferencias se desarrollaron seguidamente según el sistema Storm® para análisis de gel y transferencia y un sistema de formación de imágenes de transferencias para la cuantificación.

20 Alternativamente, se preparó una solución madre de PERASAFE® Sterilant 5X añadiendo 81 mg de polvo de PERASAFE® Sterilant a 1 ml de H₂O dd a 37°C con mezclado por torbellino para disolver.

Las figuras 1a y 1b muestran los resultados de sistemas de transferencia Western para los protocolos B y C, respectivamente. El tratamiento de oxidación solo (PERASAFE® Sterilant solamente, protocolo B) no muestra destrucción de priones, pero la oxidación seguida de tratamiento con proteasas (protocolo C) es altamente eficaz, desapareciendo el material priónico en el valor de tiempo de "cinco minutos".

25 El tratamiento de "0 minutos" en la figura 1b muestra menos material priónico que el que era de esperar, esto puede ser debido a los procedimientos implicados. Este tratamiento es realmente de aproximadamente 4 minutos y cada tratamiento probablemente es más exactamente considerado por ser prolongado en 4 minutos de forma que "5 minutos" son aproximadamente 9 minutos, "10 minutos" son aproximadamente 14 minutos, etcétera. Por tanto, 9 minutos de tratamiento parece que proporcionan la destrucción de niveles indetectables, sin temperaturas elevadas y sin tratamiento en autoclave o el uso de tratamientos químicos, cáusticos o corrosivos.

30 Ejemplo comparativo 3. Descontaminación de superficies quirúrgicas.

Los materiales de degradación de priones (agente oxidante y proteasas) producidos en el protocolo B del ejemplo 2 se llevaron a cabo sobre segmentos de alambre de acero sumergidos en homogenato infectados.

35 Los alambres de acero (5 mm x 0,15 mm) fueron incubados durante 30 minutos con un homogenato al 20% preparado a partir del cerebro de un ratón CD1 enfermo terminal con templadera de los laboratorios Rocky Mountain (RML).

Los alambres fueron tratados según la presente invención y se observó una descontaminación significativa para el tratamiento bajo el protocolo B.

Se realizó una comparación usando B, el uso de agente oxidante solo (PERASAFE® Sterilant) no fue eficaz.

40 Ejemplo comparativo 4. Descontaminación de priones usando un agente oxidante (PERASAFE® Sterilant) en combinación con proteasas de degradación de priones a 40°C

La finalidad de este experimento fue determinar la eficacia de descontaminación usando una combinación de proteasas con PERASAFE® Sterilant a aproximadamente 40°C.

45 Se siguió el protocolo A del ejemplo 1 salvo que se indique otra cosa. Se produjo una mezcla de reacción única que contenía 120 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v en un volumen total de 200 µl. Se retiraron partes alícuotas de 20 µl para diversos valores del tiempo, se inactivaron y se sometieron a análisis por transferencia Western *in toto*. Por tanto, se analizaron equivalentes de 12 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v para cada valor del tiempo. Se usó un protocolo de sensibilidad elevada para la detección de la transferencia Western de PrP, con un límite de detección conocido de 10 nl de un homogenato de cerebro al 10% p/v. Por tanto, la destrucción completa de PrP es según se puso de manifiesto mediante una falta total de inmunorreactividad es equivalente a al menos una

50 reducción de 1.200 veces de la infecciosidad.

La reacción se llevó a cabo en presencia de PERASAFE® Sterilant 1X y SDS al 1% p/v. Las formaciones sólidas de ALCALASE® y NEUTRASE® se prepararon en forma de soluciones madre de 100 mg/ml en agua y se usaron a concentraciones finales de 3,16 mg/ml y 12,63 mg/ml, respectivamente.

5 La mezcla de reacción se incubó a 40°C con muestras de 20 µl retiradas para análisis a valores de tiempo de 2, 10, 20, 30, 40 y 60 minutos. El PrP^{Sc} residual se visualizó mediante detección de transferencia Western usando anticuerpo monoclonal anti PrP biotinilado ICSM35 como el anticuerpo primario, como se muestra en la figura 2. Los encabezados de las columnas indican M para la columna de marcador, C para la columna de testigo y los tiempos de incubación como las restantes columnas. La inspección de la transferencia en la figura 2 indica que la destrucción completa (> 1.200 veces) se consiguió después de 10 minutos a 40°C.

10 Ejemplo Comparativo 5. Eficacia de descontaminación usando un ensayo de cultivo celular de infecciosidad de priones

La eficacia de la descontaminación se valoró en un cultivo celular (un ensayo celular de tembladera, SCA). Se usó una composición de descontaminación de priones que contenía PERASAFE® Sterilant 1X y SDS a 1% p/v y una mezcla de ALCALASE® y NEUTRASE® a concentraciones finales de 3,16 mg/ml y 12,36 mg/ml. La solución se usó a 40°C y 50°C con un tiempo de contacto de 10 minutos.

En este ensayo unos alambres de acero inoxidable fueron revestidos con diversas diluciones de homogenato de cerebro de animales infectados con la cepa RML (Rocky Mountain Laboratories) de priones (véase el ejemplo 3). Los alambres fueron seguidamente tratados con el reactivo de descontaminación o se usaron sin tratar. Fueron incubados con una línea celular altamente susceptible (N2a-PK1, una línea celular de neuroblastoma de múridos) clonada para que fuera altamente susceptible a priones RML (véase la publicación de Klöhn et al., PNAS, 100: 11666-11671 (2003)). A continuación de diversas tandas de crecimiento celular y dilución las células se filtraron y se sometieron a ensayo celular de tembladera estándar por unidad de prión MCR (SCA; Klöhn et al., supra) para cuantificar el número de unidades infecciosas de cultivo de tejido presentes.

20 La dilución de las proteínas RML para los alambres se representó gráficamente con respecto al número de unidades infecciosas de cultivo de tejido (TC IU). Los resultados del ensayo se muestran en la figura 3. Como se puede observar a partir de la figura 3, se consiguió una destrucción completa de contaminantes (>109 veces) después de 10 minutos a 40°C y 50°C (descon a 40°C y descon a 50°C, respectivamente).

Ejemplo de referencia 6. Optimización de concentración de dodecil-sulfato de sodio con reactivos ensayados en los ejemplos 4 y 5

30 La finalidad de este ejemplo es repetir el experimento descrito en el ejemplo 4 con concentraciones variables de tensioactivo (SDS) en ausencia del agente oxidante.

El protocolo básico usó homogenato de cerebro al 10% p/v en bruto. Se produjeron mezclas de reacciones individuales que contenían 12 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v en presencia de ALCALASE®/NEUTRASE® y concentraciones variables (0, 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0% p/v) de SDS en un volumen total de 20 µl. Las partes alícuotas se sometieron a un análisis de transferencia Western en su conjunto. Por tanto, se analizaron equivalentes de 12 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v para cada valor del tiempo.

Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de 3,16 mg/ml de ALCALASE® y 12,63 mg/ml de NEUTRASE®. La mezcla de reacción se incubó a 50°C durante 10 minutos. Se visualizó PrP^{Sc} residual mediante detección de transferencia Western usando ICSM35 biotinilado como el anticuerpo primario. Se usó el protocolo de alta sensibilidad para la detección por transferencia Western de PrP con un límite de detección conocido de 10 nl de un homogenato de cerebro al 10% p/v. La destrucción completa PrP según se puso de manifiesto por una falta total de inmunorreactividad es equivalente a al menos una reducción de >1.200 veces de la infecciosidad, que se muestra en la figura 4. Como se muestra en la figura 4, en ausencia de PERASAFE® Sterilant, ningún estado proporcionó la destrucción completa. Como tal, una concentración de SDS de 1% p/v parece ser óptima.

45 Ejemplo comparativo A. Optimización de concentración de ALCALASE® en ausencia de PERASAFE® Sterilant

Un protocolo básico usó homogenato de cerebro al 10% p/v en bruto. Cada mezcla de reacción se preparó para proporcionar un volumen total de 20 µl que contenía 17 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v. Las mezclas de reacción contenían SDS al 1% p/v, 5 mg/ml de NEUTRASE® y una gama de concentraciones de ALCALASE® desde 1,5 mg/ml hasta 250 µg/ml. Las mezclas de reacción se incubaron a 50°C durante 10 minutos. Se usó un protocolo de sensibilidad elevada para la detección por transferencia Western de PrP, con un límite de detección conocido de 10 nl de un homogenato de cerebro al 10% p/v. Por tanto, la destrucción completa de PrP se puso de manifiesto por una falta total de inmunorreactividad que es equivalente a al menos una reducción de 1.700 veces de la infecciosidad.

55 El PrP^{Sc} residual se visualizó mediante detección por transferencia Western usando ICSM35 biotinilado como el anticuerpo primario, que se muestra en la figura 5. Las columnas se identifican como M para la columna de marcador, C para el testigo y 1,5, 1,25, 1,0, 0,75, 0,50, 0,25 y 0, basadas en las concentraciones de ALCALASE®

usadas, concentraciones en mg/ml. Como se muestra en la figura 5, en ausencia de un agente oxidante (es decir PERASAFE® Sterilant), los reactivos ensayados mostraron una baja eficacia a 50°C durante más de 10 minutos.

Ejemplo comparativo B. Optimización de concentración de NEUTRASE® en ausencia de PERASAFE® Sterilant

Un protocolo básico usó homogenato de cerebro al 10% p/v en bruto. Cada mezcla de reacción se preparó para proporcionar un volumen total de 20 µl que contenía 17 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v. Las mezclas de reacción contenían SDS al 1% p/v, 1,5 mg/ml de ALCALASE® y una gama de concentraciones de NEUTRASE® de 1,5 mg/ml a 250 µg/ml. Las mezclas de reacción se incubaron a 50°C durante 10 minutos. Se usó un protocolo de sensibilidad elevada para la detección por transferencia Western de PrP, con un límite de detección conocido de 10 nl de un homogenato de cerebro al 10% p/v. Por tanto, la destrucción completa de PrP se puso de manifiesto por una falta total de inmunorreactividad que es equivalente a al menos una reducción de 1.700 veces de la infecciosidad.

El PrP^{Sc} residual se visualizó mediante detección por transferencia Western usando ICSM35 biotinilado como el anticuerpo primario, que se muestra en la figura 6. Las columnas se identifican como M para la columna de marcador, C para el testigo y 1,5, 1,25, 1,0, 0,75, 0,50, 0,25 y 0, basadas en las concentraciones de NEUTRASE® usadas, concentraciones en mg/ml. Como se muestra en la figura 6, en ausencia de agente oxidante (por ejemplo, PERASAFE® Sterilant), los reactivos ensayados mostraron una baja eficacia a 50°C durante 10 minutos.

Ejemplo de referencia 7. Optimización de concentraciones de NEUTRASE®/ALCALASE® en presencia de PERASAFE® Sterilant

La finalidad de este experimento fue mostrar que la velocidad de inclusión de enzima se podría reducir sustancialmente cuando se usa en combinación PERASAFE® Sterilant.

Un protocolo básico usó homogenato de cerebro al 10% p/v en bruto. Cada mezcla de reacción se preparó para proporcionar un volumen total de 100 µl que contenía 60 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v. Las mezclas de reacción que contenían PERASAFE® Sterilant 1X, SDS al 1% p/v, y una gama de concentraciones de ALCALASE® y NEUTRASE® (medidas mediante velocidades relativas de dilución; diluciones de 2X, 4X, 8X, 16X, 32X y 64X). Las mezclas de reacción se incubaron a 50°C durante 10 minutos y se analizaron 40 µl de cada mezcla de reacción. Se usó un protocolo de sensibilidad elevada para la detección por transferencia Western de PrP, con un límite de detección conocido de 10 nl de un homogenato de cerebro al 10% p/v. Por tanto, la destrucción completa de PrP se puso de manifiesto por una falta total de inmunorreactividad que es equivalente a al menos una reducción de 1.200 veces de la infecciosidad.

Se visualizó PrP^{Sc} residual mediante detección por transferencia Western usando ICSM35 biotinilado como el anticuerpo primario, que se muestra en la figura 7. Las columnas se identifican como M para la columna de marcador, C para el testigo y 64, 32, 16, 8, 4, 2 y 0, basados en los factores de dilución de las concentraciones de proteasas usadas. Como se muestra en la figura 7, La destrucción más elevada se produjo en la columna marcada como 2. Esto es una dilución de dos veces de las concentraciones estándar de ALCALASE®/NEUTRASE® (es decir 1,58 mg/ml de ALCALASE® y 6,32 mg/ml de NEUTRASE®). Como consecuencia se puede conseguir niveles elevados de destrucción a concentraciones de enzimas 8 veces inferiores a las previamente ensayadas en ensayos de cultivos celulares. El nivel de destrucción es de al menos 1.000 veces. La descontaminación eficaz a 50°C durante 10 minutos en presencia de PERASAFE® Sterilant con SDS al 1% p/v y concentraciones de enzimas de 400 µg/ml y 1,6 mg/ml de ALCALASE® y NEUTRASE®, respectivamente.

Ejemplo de referencia 8. Optimización adicional de concentraciones ALCALASE®/NEUTRASE® en presencia de PERASAFE® Sterilant

Un protocolo básico usó homogenato de cerebro al 10% p/v en bruto. Se preparó cada mezcla de reacción para proporcionar un volumen total de 100 µl que contenía 60 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v. Las mezclas de reacción que contenían PERASAFE® Sterilant 1X, SDS al 1% p/v, y una gama de concentraciones de ALCALASE® y NEUTRASE® a diluciones variadas (4 [790 µg/ml de ALCALASE® + 3,16 mg/ml de NEUTRASE®], 6,7 [474 µg/ml de ALCALASE® + 1,89 mg/ml de NEUTRASE®], 8,3 [379 µg/ml de ALCALASE® + 1,52 mg/ml de NEUTRASE®], 10 [316 µg/ml de ALCALASE® + 1,26 mg/ml de NEUTRASE®], y 12,5 [253 µg/ml de ALCALASE® + 1,01 mg/ml de NEUTRASE®]). Las mezclas de reacción se incubaron a 50°C durante 10 minutos y se analizaron 40 µl de cada reacción. Se usó un protocolo de sensibilidad elevada para la detección mediante transferencia Western de PrP, con un límite de detección conocido de 10 nl de un homogenato de cerebro al 10% p/v. Por tanto, la destrucción completa de PrP se puso de manifiesto mediante una falta total de inmunorreactividad que es equivalente a una reducción de al menos 1.200 veces de la infecciosidad.

Se visualizó PrP^{Sc} residual mediante detección por transferencia Western usando ICSM35 biotinilado como el anticuerpo primario, que se muestra en la figura 8. Las columnas se identifican mediante M para la columna de marcador, C para el testigo y 4, 6,7, 8,3, 10 y 12,5, basados en los factores de dilución de las concentraciones de proteasas usadas. Como se muestra en la figura 8, se pueden conseguir niveles elevados de destrucción a concentraciones de ALCALASE® y NEUTRASE® 10 veces menores que las previamente ensayadas en cultivos celulares.

Ejemplo comparativo C. Ensayo de componentes individuales que comprenden PERASAFE® Sterilant con SDS y enzimas

Un protocolo básico usó homogenato de cerebro al 10% p/v en bruto. Cada mezcla de reacción se preparó para proporcionar un volumen total de 20 µl que contenía 16 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v. Las mezclas de reacción contenían SDS al 1% p/v, 750 g/ml de ALCALASE®, 3 mg/ml de NEUTRASE® más diversos componentes de PERASAFE® Sterilant.

Columna	Componente
(a)	Estabilizadores/Inhibidores de la corrosión (191 µg/ml)
(b)	Tensioactivo (165 µg/ml)
(c)	Ácido orgánico (3,36 mg/ml)
(d)	Activador (4,44 mg/ml)
(e)	Agente oxidante (8,03 mg/ml)
(f)	Agua (testigo)

Las reacciones se incubaron a 50°C durante 10 minutos y se analizaron 40 µl de cada reacción. Se usó un protocolo de sensibilidad elevada para la detección mediante transferencia Western de PrP, con un límite de detección conocido de 10 nl de un homogenato de cerebro al 10% p/v. Por tanto, la destrucción completa de PrP se puso de manifiesto mediante una falta total de inmunorreactividad, que es equivalente al menos a una reducción de 1.600 veces de la infecciosidad.

Se visualizó PrP80 residual mediante detección por transferencia Western usando ICSM35 biotinilado como el anticuerpo primario, como se muestra en la figura 9. Las columnas se identifican como M para la columna de marcador, C para el testigo y a-f, basándose en el componente anteriormente identificado. La figura 9 muestra que ningún componente único produjo niveles de destrucción comparables a los observados con PERASAFE® Sterilant activo (e). Parece que la eficacia es un resultado de la actividad oxidativa producida por ácido peracético a partir de TAED/perborato de sodio. Sin embargo, cuando se combina con proteasas en las composiciones de esta invención, se consigue una destrucción de priones significativamente mejorada.

Ejemplo de referencia 9. Repetición de la optimización de concentraciones de ALCALASE®/NEUTRASE® en presencia de PERASAFE® Sterilant

Se repitió el experimento descrito en el ejemplo 8 para confirmar que una reducción de 10 veces los niveles de enzima en la formulación era eficaz cuando las enzimas se combinan con agente oxidante.

Un protocolo básico uso homogenato de cerebro al 10% p/v. Cada mezcla de reacción se preparó para proporcionar un volumen total de 100 µl que contenía 60 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v. Las mezclas de reacción contenían PERASAFE® Sterilant 1X, SDS al 1% p/v y una gama de concentraciones de ALCALASE® y NEUTRASE® (4 [790 µg/ml de ALCALASE® + 3,16 mg/ml de NEUTRASE®], 6,7 [474 µg/ml de ALCALASE® + 1,89 mg/ml de NEUTRASE®], 8,3 [379 µg/ml de ALCALASE® + 1,52 mg/ml de NEUTRASE®], 10 [316 µg/ml de ALCALASE® + 1,26 mg/ml de NEUTRASE®], y 12,5 [253 µg/ml de ALCALASE® + 1,01 mg/ml de NEUTRASE®]). Las mezclas de reacción se incubaron a 50°C durante 10 minutos y se analizaron 40 µl de cada reacción. Se usó un protocolo de sensibilidad elevada para la detección mediante transferencia Western de PrP con un límite de detección conocido de 10 nl de un homogenato de cerebro al 10% p/v. Por tanto, la destrucción completa de PrP se puso de manifiesto mediante una falta total de inmunorreactividad, que es equivalente al menos a una reducción de 1.200 de la infecciosidad.

Se visualizó PrP^{Sc} residual mediante detección por transferencia Western usando ICSM35 biotinilado como el anticuerpo primario, como se muestra en la figura 10. Las columnas se identifican como M para la columna de marcador, C para el testigo y 4, 6,7, 8,3, 10 y 12,5, basados en los factores de dilución de las concentraciones de proteasas usadas. La figura 10 muestra que se pueden conseguir niveles elevados de destrucción a concentraciones de ALCALASE® y NEUTRASE® al menos 10 veces inferiores a las previamente ensayadas en cultivos celulares. La figura 10 confirma los descubrimientos previos en el ejemplo 8.

Ejemplo 10. Ensayo adicional de componentes individuales que comprenden PERASAFE® Sterilant con SDS y enzimas + combinaciones activas redox

Un protocolo básico usó homogenato de cerebro al 10% p/v en bruto. Cada mezcla de reacción se preparó para proporcionar un volumen total de 20 µl que contenía 13 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v. Las mezclas de reacción contenían SDS al 1% p/v, 300 µg/ml de ALCALASE®, 1,2 mg/ml de NEUTRASE® más varios componentes de concentraciones de PERASAFE® Sterilant.

Columna	Componente
(a)	PERASAFE® Sterilant (16,2 g/l) (1X)
(b)	PERASAFE® Sterilant (8,1 g/l) (0,5X)
(c)	PERASAFE® Sterilant (3,24 g/l) (0,2X)
(d)	Estabilizadores/Inhibidores de la corrosión (191 mg/ml)
(e)	Perborato de sodio + activador (8,03 mg/ml)

Las reacciones se incubaron a 50°C durante 10 minutos y se analizaron 40 µl de cada reacción. Se usó un protocolo de sensibilidad elevada para la detección mediante transferencia Western de PrP, con un límite de detección conocido de 10 nl de un homogenato de cerebro al 10% p/v. Por tanto, la destrucción completa de PrP se puso de manifiesto mediante una falta total de inmunorreactividad, que es equivalente a al menos una reducción de 1.300 veces de la infecciosidad.

Se visualizó PrP^{Sc} residual mediante detección por transferencia Western usando ICSM35 biotinilado como el anticuerpo primario, como se muestra en la figura 11. Las columnas se identifican como M para la columna de marcador, C para el testigo y a-e, basadas en el componente anteriormente identificado. La figura 11 muestra niveles elevados de destrucción que se confirmaron con PERASAFE® Sterilant 1X en presencia de SDS al 1% p/v, 300 µg/ml de ALCALASE® y 1,2 mg/ml de NEUTRASE®. Parece que una velocidad de inclusión reducida de PERASAFE® Sterilant 0,5X puede proporcionar niveles suficientes de descontaminación.

Ejemplo 11. Comparación de la eficacia de descontaminación mediante PERASAFE® Sterilant 1X basado en la composición de descontaminación a 40°C y 50°C

La finalidad del siguiente experimento fue comparar la eficacia de descontaminación mediante la composición de descontaminación (PERASAFE® Sterilant 1X + SDS al 1% p/v + 300 µg/ml de ALCALASE® + 1,2 mg/ml de NEUTRASE®) a 40°C y 50°C.

Un protocolo básico usó homogenato de cerebro de vCJD al 10% p/v. Se usó una mezcla de reacción que contenía 60 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v en un volumen total de 100 µl para cada temperatura. Las mezclas de reacción contenían una formulación equivalente de la mezcla de descontaminación [PERASAFE® Sterilant 1X y SDS al 1% p/v + 300 µg/ml de ALCALASE® + 1,2 mg/ml de NEUTRASE®]. Se retiraron partes alícuotas de 20 µl para diversos valores del tiempo, se inactivaron añadiendo tampón de carga 2x de SDS y congelando en nitrógeno líquido. Todas las mezclas de reacción se descongelaron y se llevaron a ebullición antes de ser sometidas a detección mediante transferencia Western para PrP^{Sc} residual usando ICSM35 biotinilado como el anticuerpo primario.

Se tomaron muestras de las mezclas de reacción (40°C frente a 50°C) para los tiempos de 0, 2, 5, 10 y 20 minutos y los resultados se muestran en la figura 12, con los tiempos de muestras en las marcas de las columnas. C es para el testigo. Los niveles de inmunorreactividad en la figura 12 fueron cuantificados mediante densitometría y se representaron gráficamente en función del tiempo en la figura 13. Las curvas cinéticas que describen la pérdida de PrP, % de inmunorreactividad restante, con respecto al tiempo en minutos se ajustaron a funciones de caída exponencial doble y los resultados superpuestos como líneas para todos los datos en la figura 13. Se observó una ligera reducción en la velocidad de destrucción a 40°C respecto a 50°C. Sin embargo, se consiguieron niveles muy elevados de destrucción después de un tiempo de incubación de 10 minutos a ambas temperaturas.

Ejemplo 12. Comparación de agentes oxidantes con PERASAFE® Sterilant como aditivos para la composición para descontaminar entidades infectadas

La finalidad de los siguientes ejemplos fue comparar agentes oxidantes químicos para ser usados en la composición de descontaminación que comprende SDS (1% p/v) y dos proteasas de degradación de priones (300 µg/ml de ALCALASE® y 1,2 mg/ml de NEUTRASE®). Los agentes oxidantes incluían NaDCC (dicloroisocianurato de sodio), PROXITANE® (un desinfectante basado en ácido peracético disponible en la empresa Solvay Chemicals, Bruselas, Bélgica), desinfectante VIRKON® S (un desinfectante que comprende peroximonosulfato de potasio y NaCl, dodecibenceno-sulfonato de sodio y ácido sulfúrico), solución de hipoclorito (es decir, blanqueador) y PERASAFE® Sterilant.

Un protocolo básico usó homogenato de cerebro de vCJD al 10% p/v. Cada mezcla de reacción se preparó usando 60 µl de homogenato de cerebro al 10% p/v en un volumen total de 100 µl. Se usaron concentraciones constantes de SDS y enzimas [SDS al 1% p/v + 300 µg/ml de ALCALASE® + 1,2 mg/ml de NEUTRASE®]. En todas las mezclas de reacción y todas las mezclas de reacción se incubaron durante 10 minutos a 50°C.

La reacción A contenía 16,2 mg/ml de PERASAFE® Sterilant estándar.

La reacción B contenía 13,0 mg/ml de PERASAFE® Sterilant estándar.

La reacción C contenía 13,0 mg/ml de PERASAFE® Sterilant.

La reacción H contenía una dilución 1:70 de solución de hipoclorito (es decir, blanqueador), (pH 8,0).

La reacción N contenía 3,34 mg/ml de NaDCC.

La reacción P contenía 30 mg/ml de PROXITANE® (pH 6,5).

5 La reacción V contenía 20 mg/ml de VIRKON® S (pH 6,0).

Se retiraron partes alícuotas de 20 µl después de una incubación de 10 minutos y se inactivaron añadiendo tampón de carga 2x SDS y congelando en nitrógeno líquido. Todas las mezclas de reacción se descongelaron y se llevaron a ebullición antes de ser sometidas a detección mediante transferencia Western para PrP^{Sc} residual usando ICSM35 biotinilado como el anticuerpo primario. Los resultados se muestran en la figura 14. Las columnas en el gel corresponden a las reacciones anteriormente citadas.

10

Como se muestra en la figura 14, otros agentes oxidantes son eficaces cuando se usan como el agente oxidante en una composición de descontaminación que comprende tensioactivo y las dos proteasas de degradación de priones diferentes. Los niveles de inmunorreactividad en la figura 14 se cuantificaron mediante densitometría y se expresaron como un porcentaje del valor de la concentración, % de inmunorreactividad, en la figura 15.

15

REIVINDICACIONES

1. Un método secuencial para la descontaminación o desinfección de priones, que comprende:
 - (a) poner en contacto en primer lugar una entidad contaminada con priones que va a ser descontaminada con al menos un tensioactivo, y seguidamente
 - 5 (b) poner en contacto la entidad con un agente oxidante, en que dicho agente oxidante comprende una fuente de peroxígeno y un activador, y seguidamente
 - (c) poner en contacto la entidad con al menos una proteasa.
2. El método de la reivindicación 1, en que el agente oxidante comprende:
 - (a) perborato o percarbonato; y
 - 10 (b) tetraacetil-etilenodiamina (TAED) o N-acetil-caprolactama.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en que la al menos una proteasa comprende Neutrasa aislada a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* o Alcalasa aislada a partir de *Bacillus licheniformis*.
4. El método según la reivindicación 1 o 2, en que el al menos un tensioactivo es dodecil-sulfato de sodio.

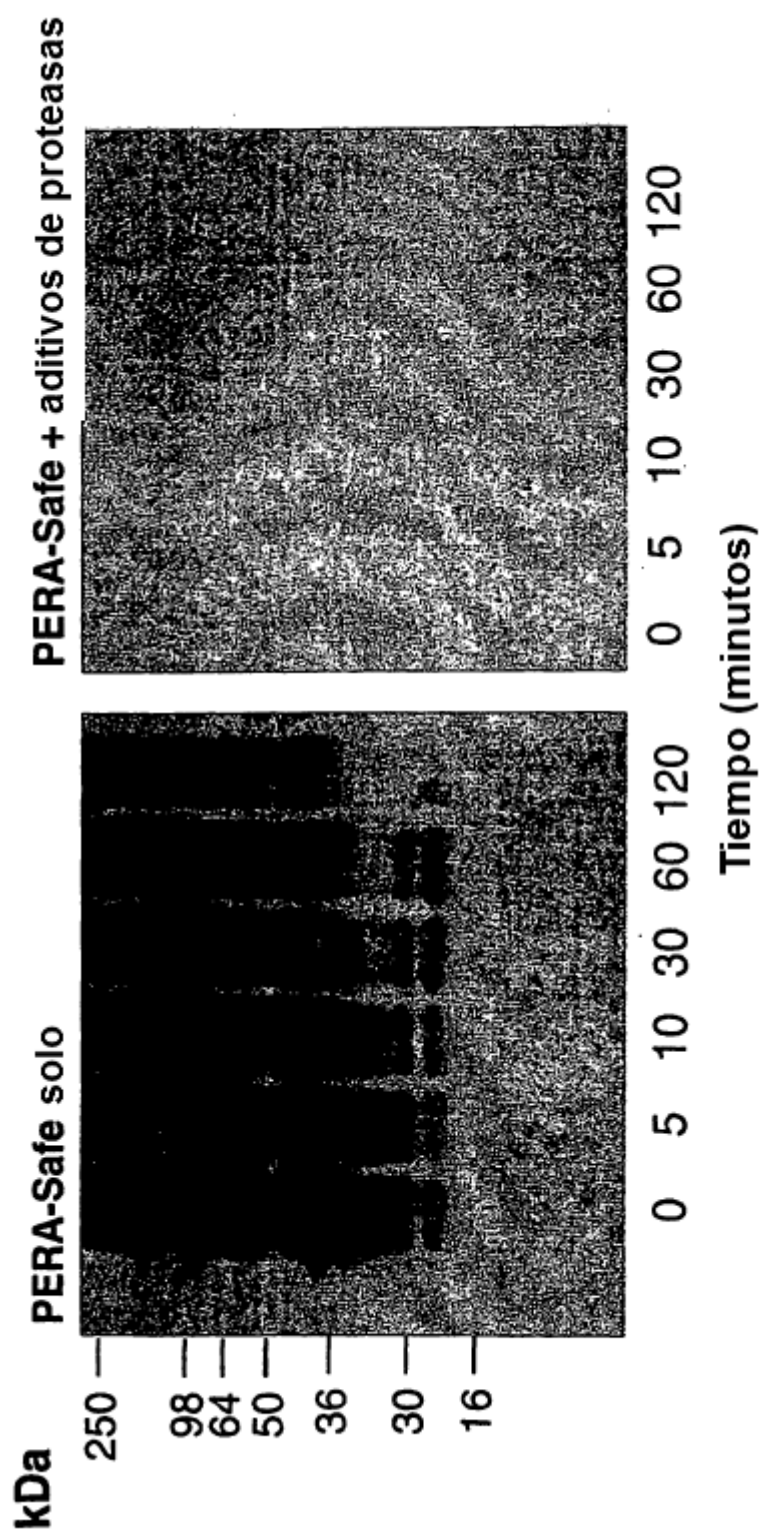


FIG. 1

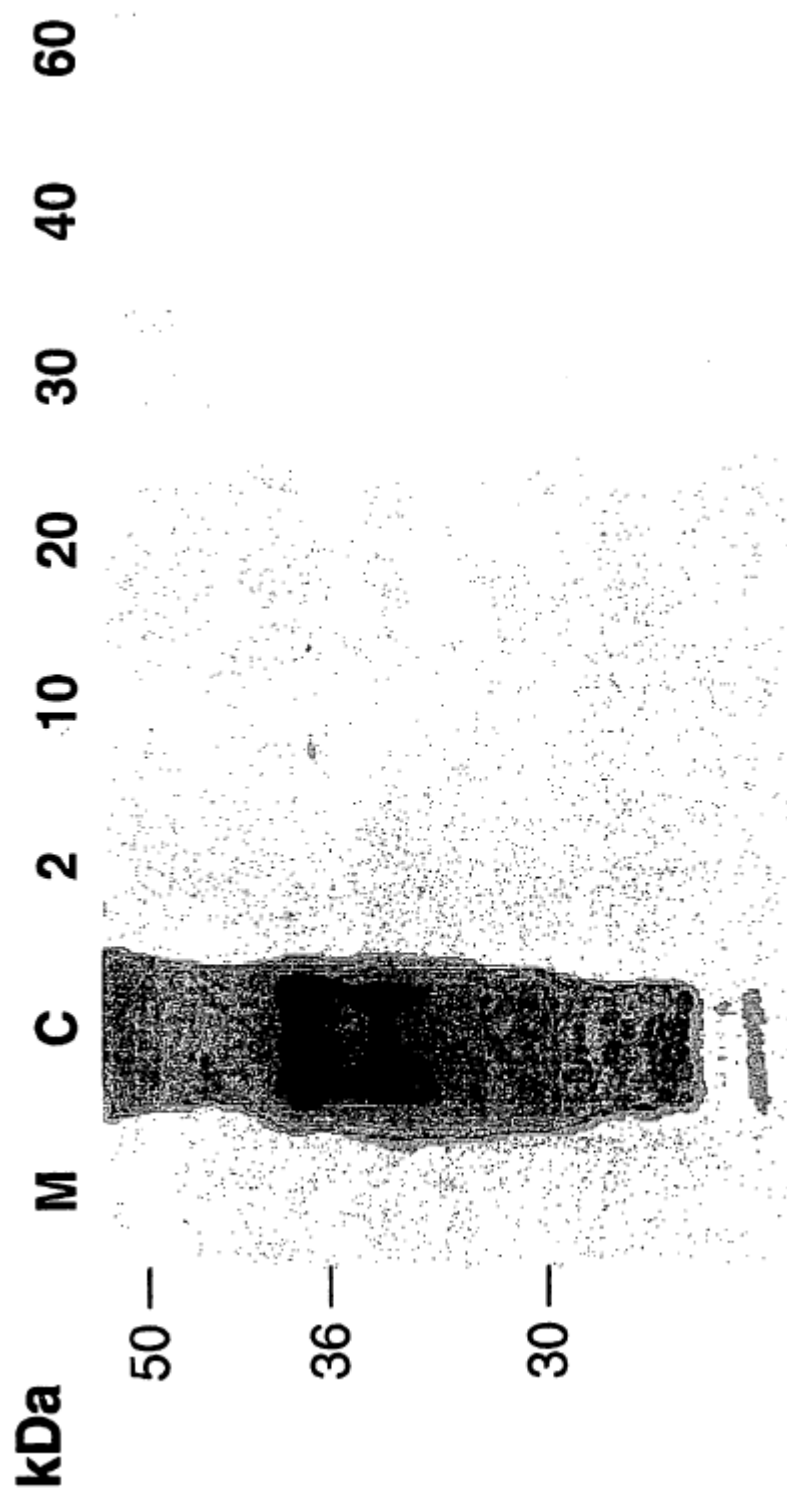
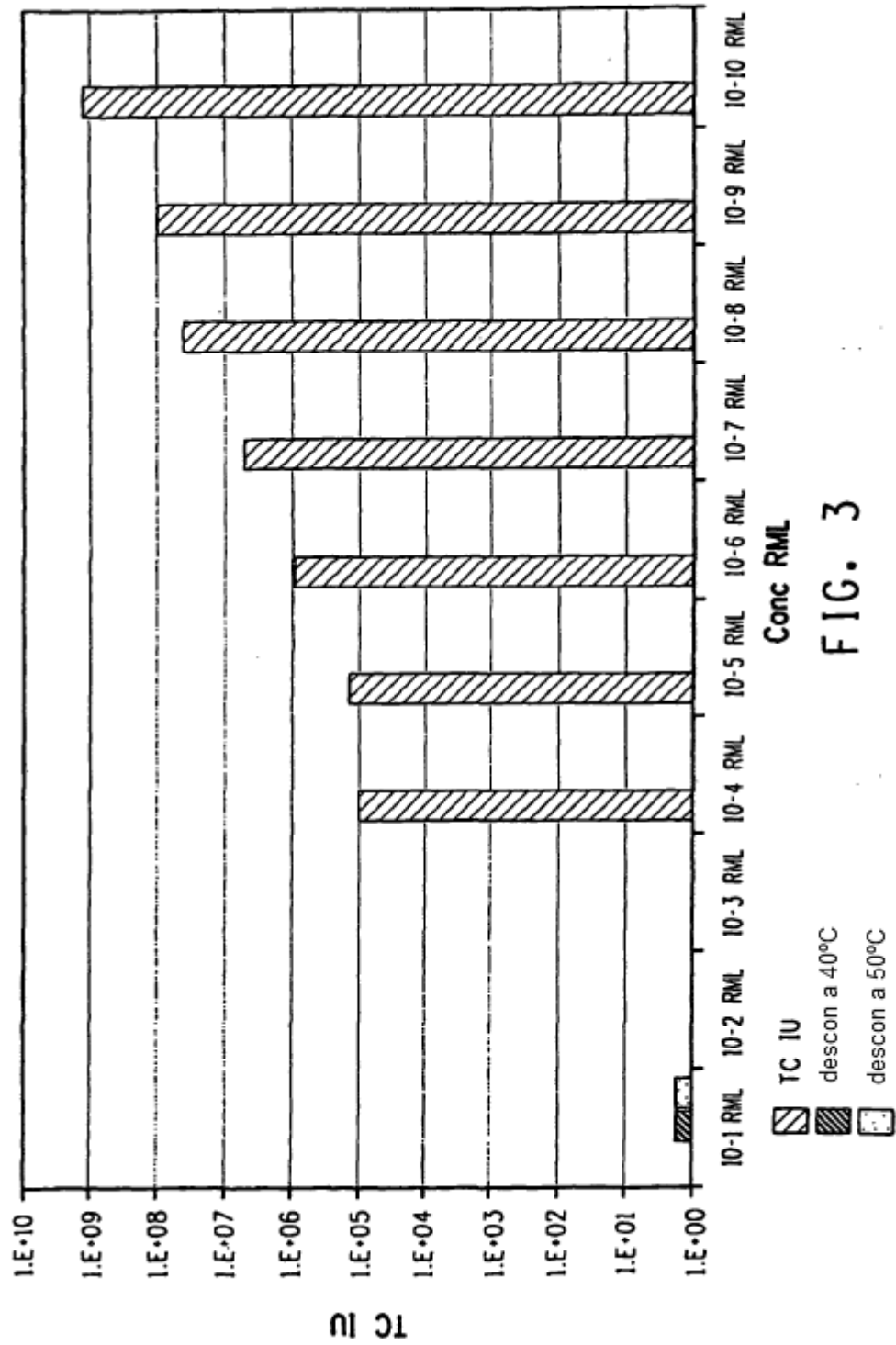


FIG. 2



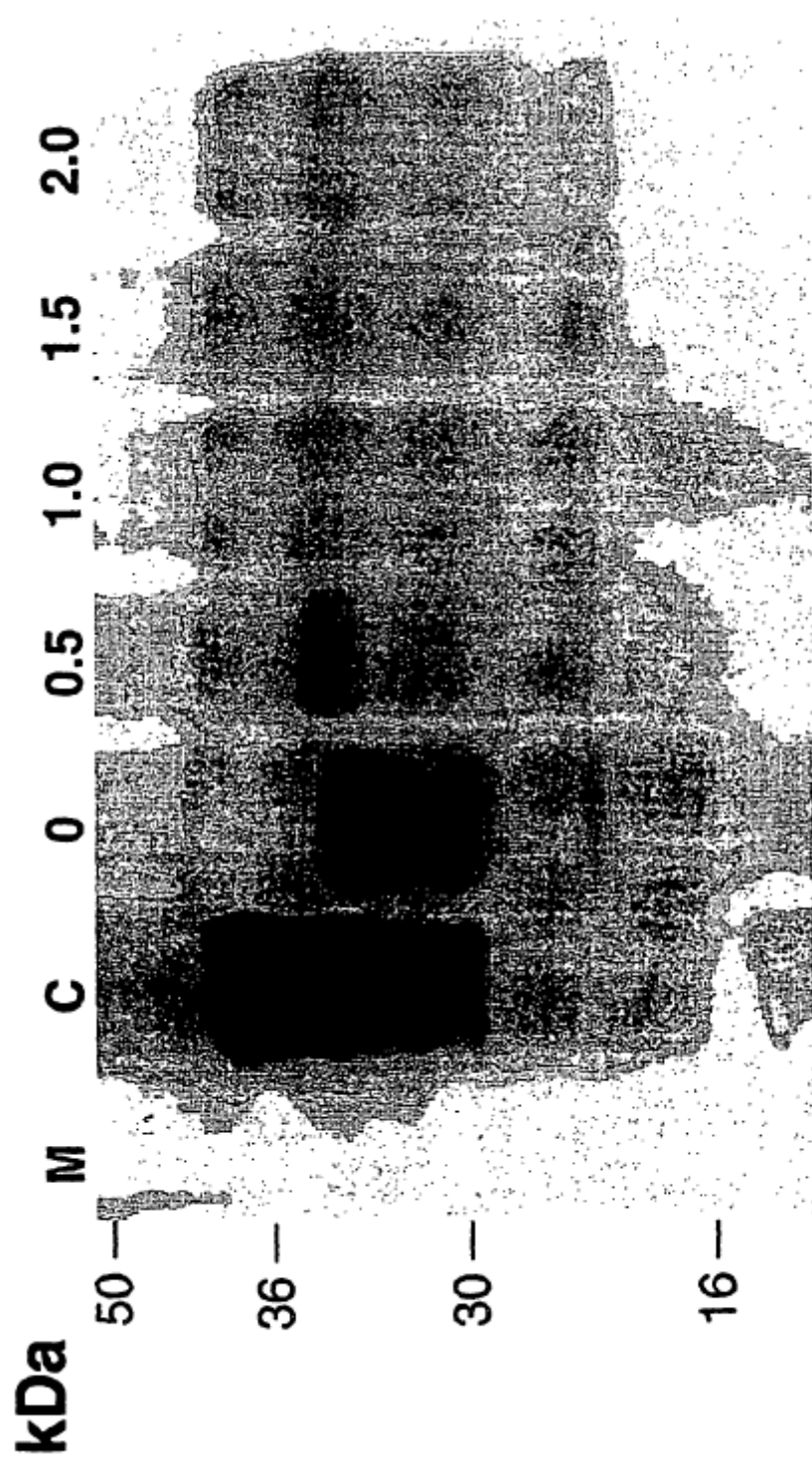


FIG. 4

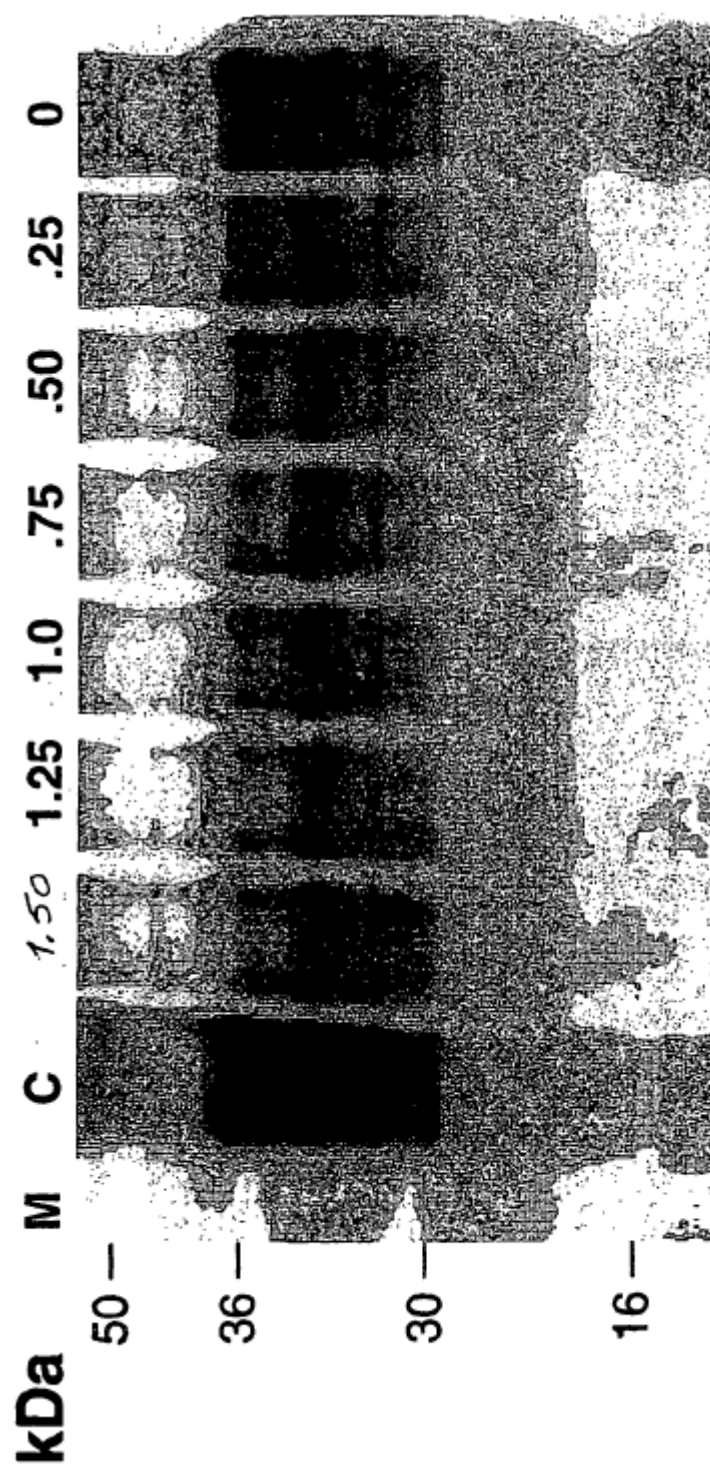


FIG. 5

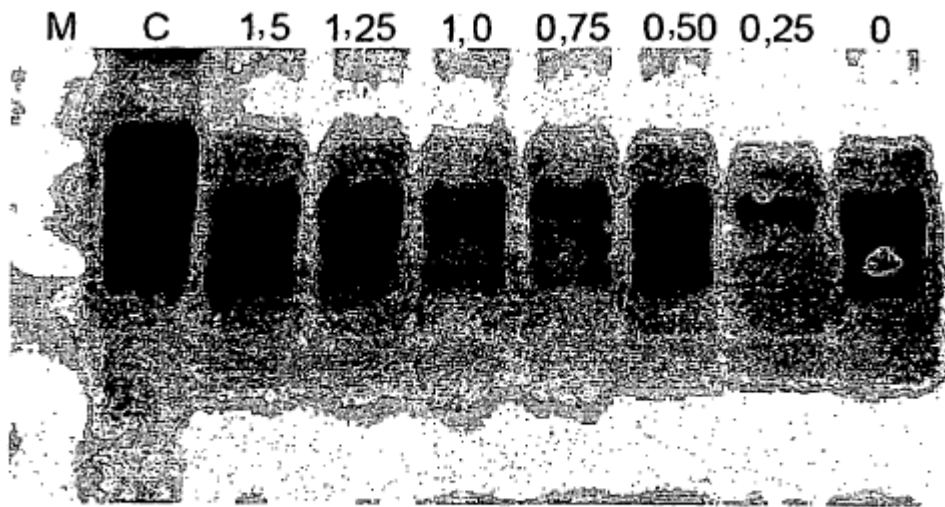


FIG. 6

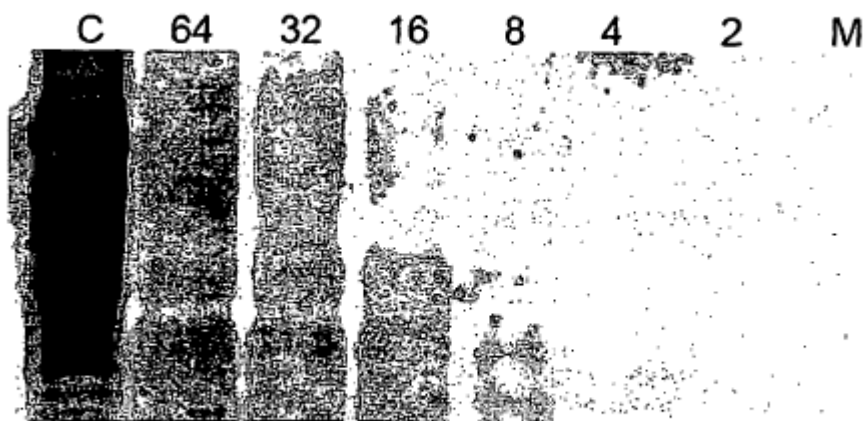


FIG. 7

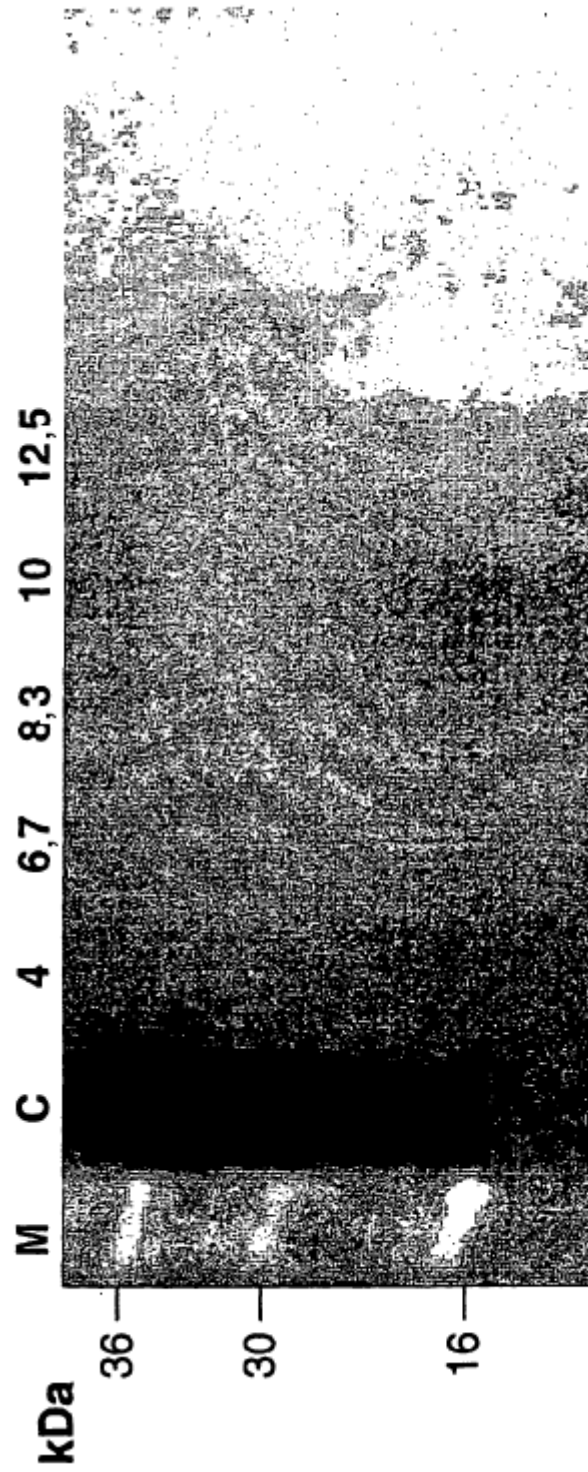


FIG. 8

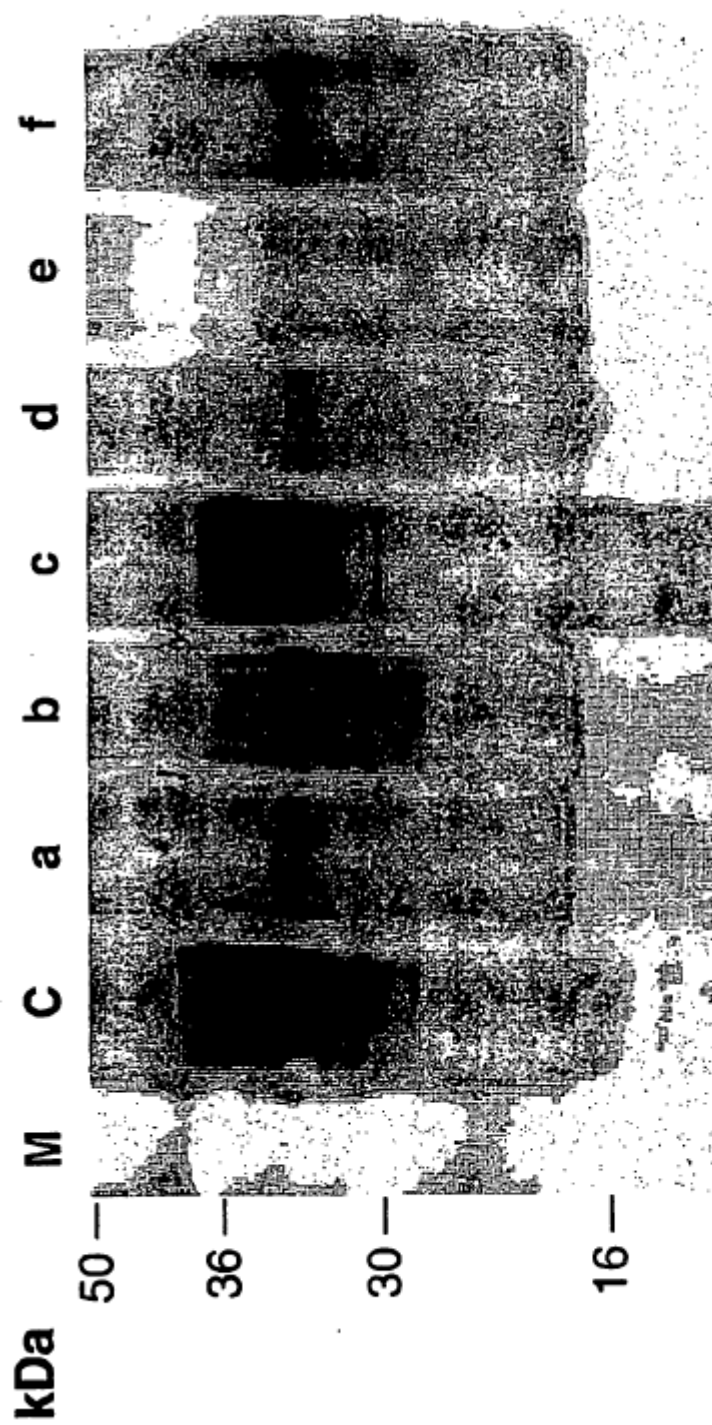


FIG. 9

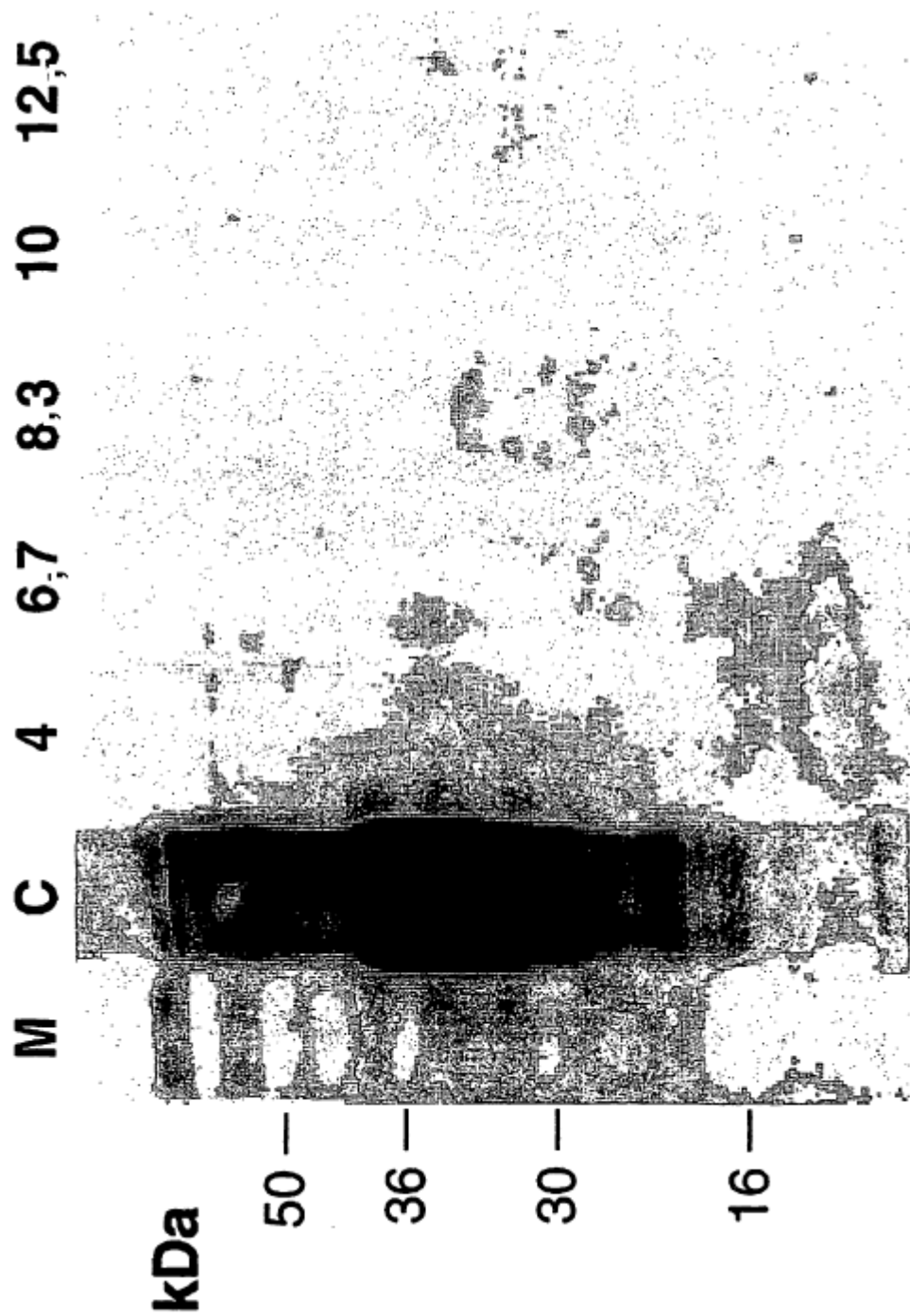


FIG. 10

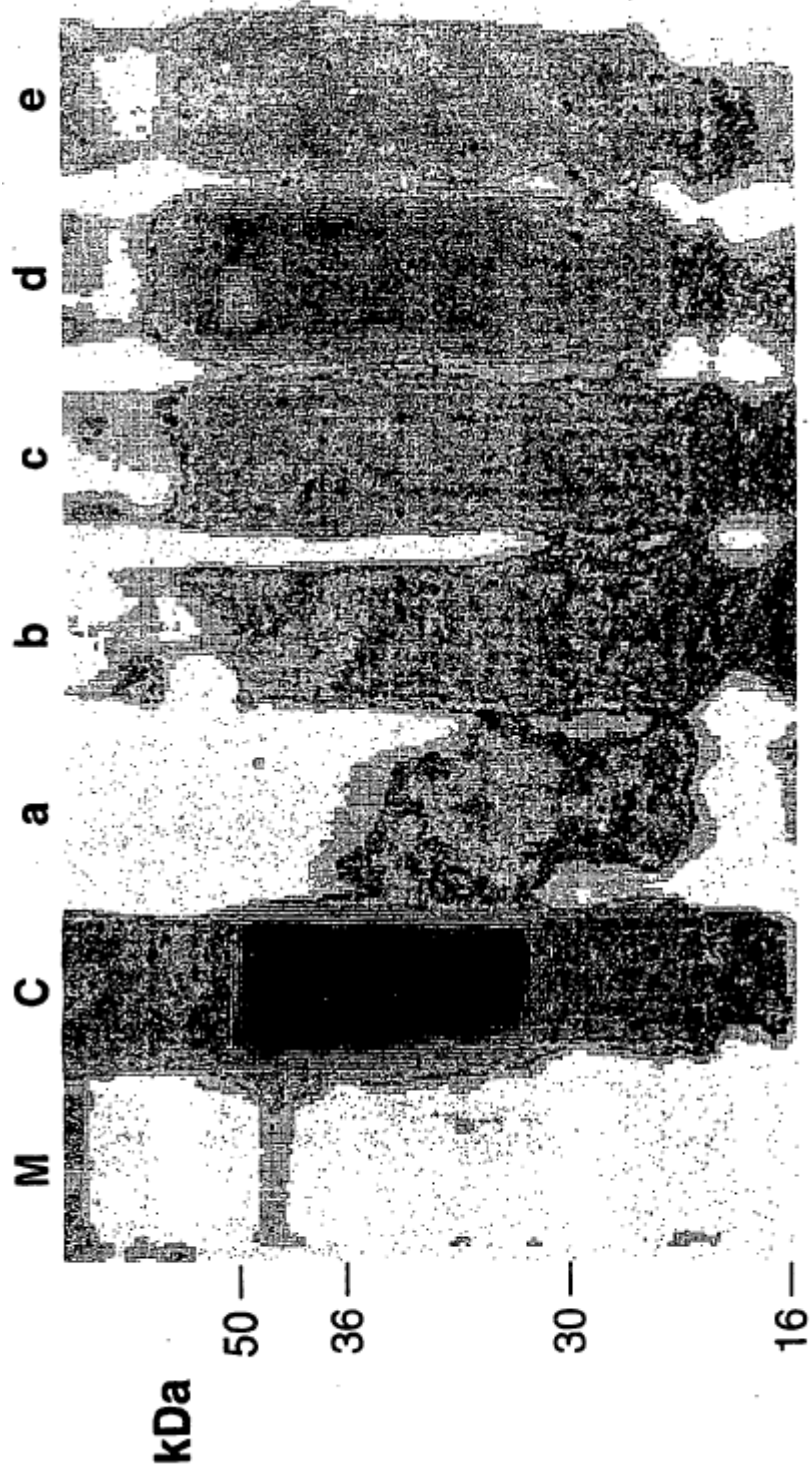


FIG. 11

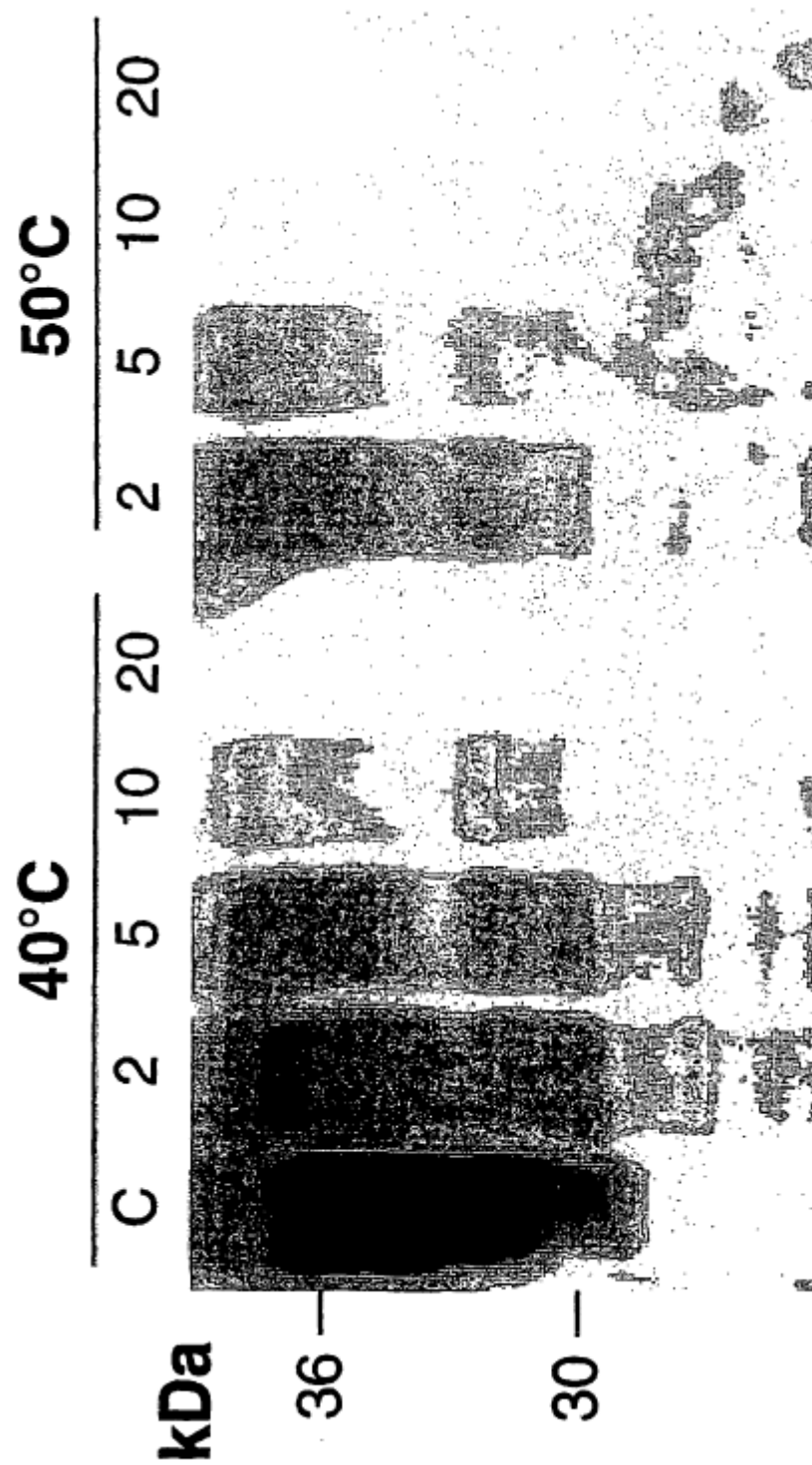


FIG. 12

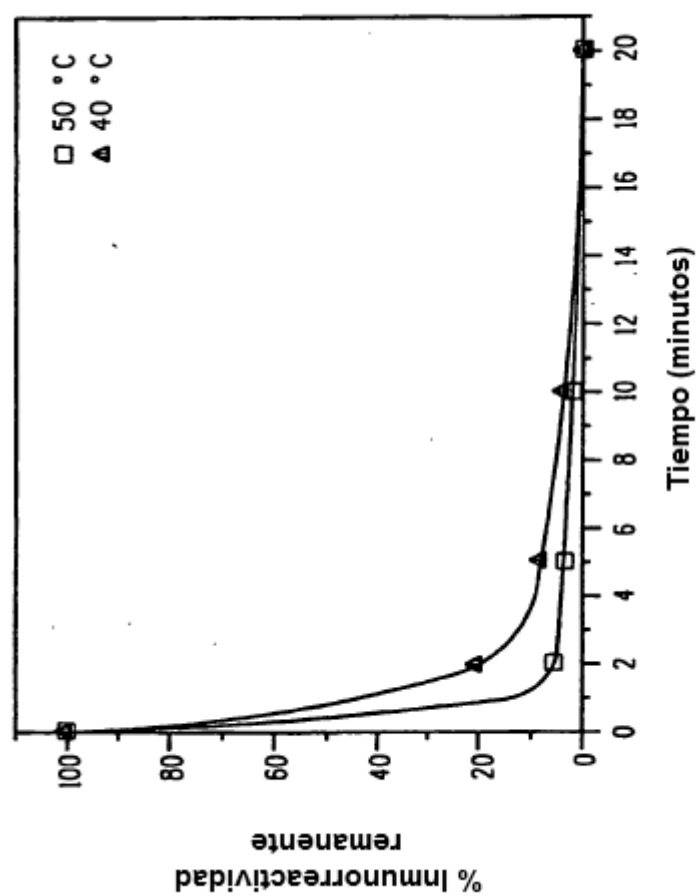


FIG. 13

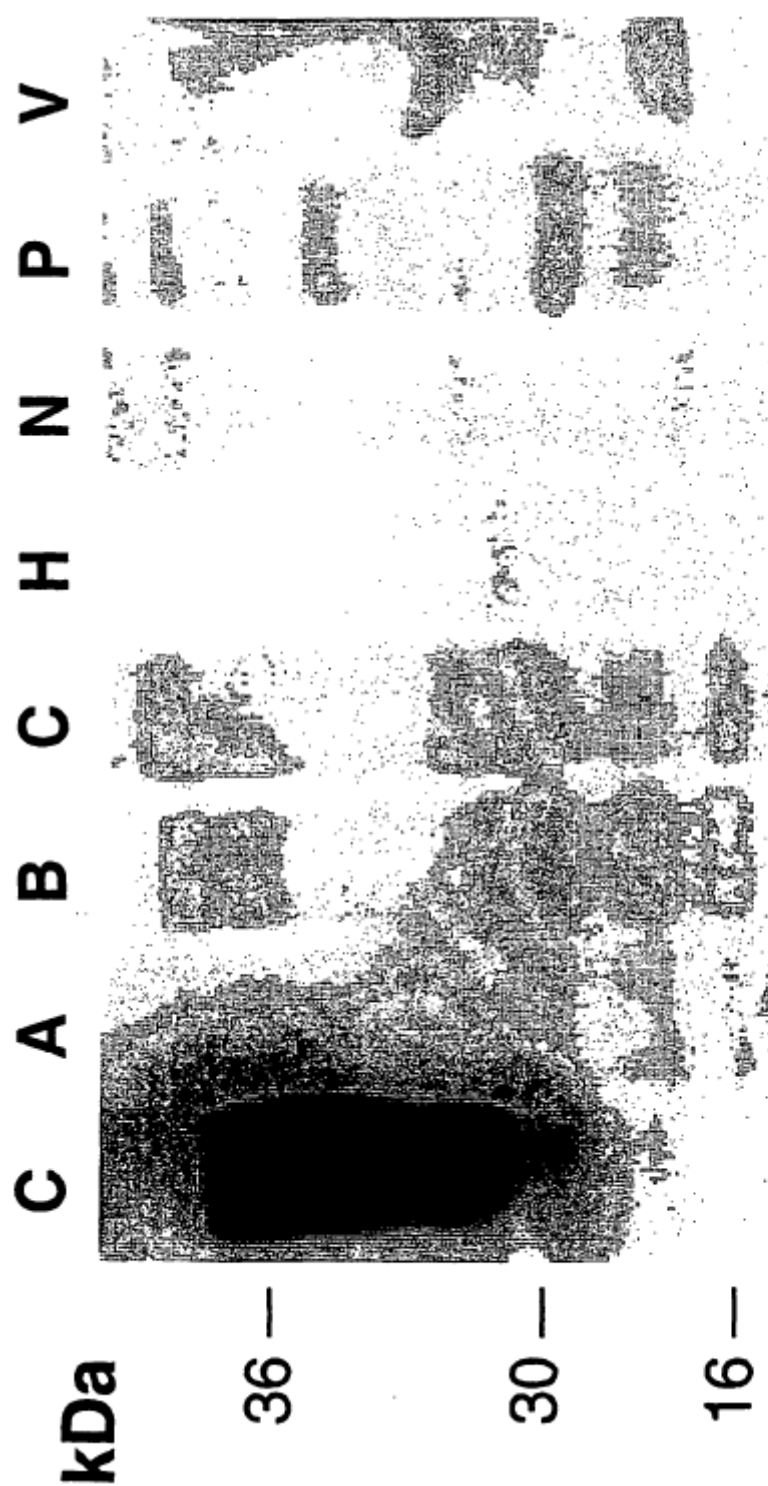


FIG. 14

