

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-503209

(P2007-503209A)

(43) 公表日 平成19年2月22日(2007.2.22)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02		4 B O 6 3
<b>G O 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	D	
<b>G O 1 N 30/88</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 30/88	J	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2006-524391 (P2006-524391)	(71) 出願人	500280870
(86) (22) 出願日	平成16年8月23日 (2004. 8. 23)		ラボラトワール、フランセ、デュ、フラク
(85) 翻訳文提出日	平成18年4月17日 (2006. 4. 17)		ショヌマン、エ、デ、ピオテクノロジー
(86) 国際出願番号	PCT/FR2004/002179		LABORATOIRE FRANCAIS
(87) 国際公開番号	W02005/022148		S DU FRACTIONNEMENT
(87) 国際公開日	平成17年3月10日 (2005. 3. 10)		ET DES BIOTECHNOLOGIES
(31) 優先権主張番号	0310126		フランス国レ、ジュリ、アブニュ、デ、ト
(32) 優先日	平成15年8月25日 (2003. 8. 25)		ロピック、3、ゾーヌ、ダクティビテ、ド
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		、コルタブフ
		(74) 代理人	100065215
			弁理士 三枝 英二
		(74) 代理人	100076510
			弁理士 掛樋 悠路

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NCTAの*in vitro*測定方法、及び、生物学的産物を生産する方法の評価及び/またはモニタリング方法へのそれらの適用

## (57) 【要約】

【課題】本発明は、トランスジェニックセルラインを使用する、非通常型伝達性因子(NCTA)の*in vitro*測定のための方法に関する。本発明はまた：生物学的産物の有効性の*in vitro*評価及び/またはモニタリングのための方法または処理方法への前述の*in vitro*測定方法の、あるいは、NCTAの除去のためのこのような方法への一つ以上の工程の適用、ならびに、汚染除去手順の*in vitro*評価及び/またはモニタリングのための方法へのその適用に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

非通常型伝達性因子 (NCTA) の複製に耐性である安定したトランスジェニック細胞が生物学的産物に接触され、次いで、前記 NCTA の複製により前記生物学的産物に存在する NCTA の量を増幅するために一つ以上継代で培養することを特徴とする、生物学的産物内の非通常型伝達性因子 (NCTA) の *in vitro* 滴定方法。

## 【請求項 2】

安定したトランスジェニック細胞が、生物学的に許容される水溶液中の該生物学的産物の少なくとも一つの希釈物存在下で培養されることを特徴とする、請求項 1 に記載の滴定方法。

10

## 【請求項 3】

該 NCTA が各継代で検出されることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の滴定方法。

## 【請求項 4】

該 NCTA が免疫化学方法により各継代で検出されることを特徴とする、請求項 3 に記載の滴定方法。

## 【請求項 5】

該 NCTA がウエスタンブロットにより各継代で検出されることを特徴とする、請求項 4 に記載の滴定方法。

## 【請求項 6】

該 NCTA が ELISA により各継代で検出されることを特徴とする、請求項 4 に記載の滴定方法。

20

## 【請求項 7】

該 NCTA がプリオンタンパク質 PrP<sup>sc</sup> の病原形態に一致することを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれかひとつに記載の滴定方法。

## 【請求項 8】

該安定したトランスジェニック細胞がウサギ上皮細胞であることを特徴とする、請求項 1 から 7 のいずれかひとつに記載の滴定方法。

## 【請求項 9】

該安定したトランスジェニック細胞が、Rov9 セルライン由来のウサギ上皮細胞であることを特徴とする、請求項 7 または 8 に記載の滴定方法。

30

## 【請求項 10】

該安定したトランスジェニック細胞がマウスのグリア細胞であることを特徴とする、請求項 1 から 7 のいずれかひとつに記載の滴定方法。

## 【請求項 11】

該安定したトランスジェニック細胞が、MovS6 セルライン由来のマウスグリア細胞であることを特徴とする、請求項 7 および 10 に記載の滴定方法。

## 【請求項 12】

該生物学的産物が、血液産物及びそれらの製剤、食料、化粧品及び環境に害となる製品からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 から 11 のいずれかひとつに記載の滴定方法。

40

## 【請求項 13】

請求項 1 から 12 のいずれかひとつに記載の滴定方法が、プロセスの上流及び下流で、前記生物学的産物に適用されること、及び、両者の得られた力価の値を比較することを特徴とする、NCTA で汚染されやすい生物学的産物を得る、または、処理するプロセスの *in vitro* 評価及び / または制御方法。

## 【請求項 14】

血液産物及びそれらの製剤の精製プロセスへの、請求項 13 に記載の評価及び / または制御方法の適用。

## 【請求項 15】

50

該精製プロセスがクロマトグラフィーまたはナノ濾過であることを特徴とする、請求項14に記載の適用。

【請求項16】

材料の汚染除去手順の *in vitro* 評価及び/または制御方法であって、汚染除去されるべき材料がNCTAを含有する生物学的産物と接触すること、及び、請求項1から12のいずれかひとつに記載の滴定方法を、前記手順の上流及び下流で、前記生物学的産物に適用すること、及び、両者の得られた力価の値を比較することを特徴とする、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、トランスジェニックセルラインを使用する非通常型伝達性因子(NCTA)の *in vitro* 滴定方法、生物学的産物を得るまたは処理するプロセスの、あるいは、NCTAを除去するプロセスの一つ以上の工程の有効性の *in vitro* での評価及び/または制御へのその適用、ならびに、汚染除去手順の *in vitro* 評価及び/または制御方法へのその適用に関する。

【背景技術】

【0002】

伝達性海綿状脳症(TSE)は、中枢神経系(CNS)の変性により特徴付けられる遺伝的または後天的疾患の群であり、ヒトに、とりわけ、クロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)として知られ、また、多数の哺乳動物、より詳細には羊及び牛に影響を及ぼす(スクレイビー及びウシ海綿状脳症)。この特性のために、これらの疾患の病原体は、いわゆる「非通常型伝達性因子(non-conventional transmissible agents)」(NCTA)の群に分類される。病因は知られていない。しかし、該病気の特徴は、プリオンタンパク質(PrP)と呼ばれる細胞外タンパク質の存在であり、これは疾患の過程で、プロテイナーゼKのようなプロテアーゼに耐性を有する、不溶性形態にトランスフォームされ、そして、細胞に蓄積し、そして、それらの死を誘導する。PrP<sup>sc</sup>と呼ばれる、PrPのこの異常な病原形態は、プリオンタンパク質PrPのコンフォメーション変化の結果である。PrPをコードする遺伝子発現変化の、また翻訳改変の証拠も示さなかった(P. Brown, Transfusion, 41, 4333-436, 2001 et D. Volkel et al., Transfusion, 41, 441-448, 2001)。

【0003】

*in vitro* または *in vivo* でのトランスジェネシスは、TSEの理解に非常に貢献する。PrP<sup>sc</sup>をコードする遺伝子が不活化された、このようなマウスは、実験感染に対して高い耐性を有する。反対に、家族性TSEを患う個体のPrP遺伝子から、または、外来遺伝子からクローンとして作成された病原性トランスジーンを発現する(または過剰発現する)マウス及び細胞培養物は、対応する遺伝性疾患を模倣しており、該トランスジーンと同じ種に属する感染対象由来の接種物に敏感である。トランスジェニックセルラインはまた、PrP<sup>sc</sup>へのPrPのトランスコンフォメーションと影響しあう分子の研究のための、*in vitro* でのモデルとしても使用される。

【0004】

現在利用可能なデータは、TSEの原因である伝達性因子が、感染形態で血中及び血液産物中に存在するという事実を許容しない(上記参考文献P. Brownを参照)。しかし、この不確定さは、一方で、血中のおそらく非常に低い濃度が、他方で、いったん確立された疾患の非常に長い培養期間が原因で、それが存在しないという結論を下すことはできない。

【0005】

さらに、NCTAの驚くべき耐性は、血漿由来の寒冷沈降性タンパク質(Factor VIII, Factor von Willebrandなど)のような、血液製剤のウイルス負荷の減少に有効であることが立証されている、溶剤/界面活性剤Tween-TNP処理のような、古典的に行われる不活化プロセスの使用を妨げる。実際、これら

10

20

30

40

50

は、例えばNaOH 1M存在下で、感染の減少のための既知のプロセスにより完全に分解され得る。

【0006】

凝固血漿タンパク質のような、生物学的産物の製造または処理が、それらの治療的な使用を考慮して、ウイルス不活化/除去工程を取り入れるべきである場合、血漿製剤製造工業は、血漿由来産物を介するCJD変異型の伝達の理論上のリスクを評価することを試みる。

【0007】

ゆえに、敏感な、特異的な及び迅速な滴定方法の開発が必要であり、これはNCTAの除去程度の評価のために使用され得、これは、生物学的産物精製プロセスの目的において、または、材料の汚染除去手順(特に再利用可能な材料の)目的で行われる、一つの工程、または連続した工程に由来する。

【0008】

現在、通常に行われているプロセスは、病原性プリオンを負荷した試験される産物の種々の希釈物の脳内注入による、ゴールドンハムスターの感受性セルラインによる*in vivo*での滴定方法を使用する。実施した希釈物に応じた異なる群において、影響を受けた動物の数によって、感染価が計算され得、そして、与えられたプロセスの減少ファクターは、非処理標準から設定される。しかし、この方法の欠点は、長期間、高コスト及び、プリオン除去効果の迅速な理解が要求される工業規模における開発との低い適合性である。

【0009】

さらに、滴定方法の感度の向上について、感染因子の濃縮工程を導入することが、しばしば必要である。現在、TSEの原因である感染因子の全てのこれらの濃縮手順は、PrP<sup>Sc</sup>との共-精製である。

【0010】

さらに、広く知られた方法は、TSEsの感染因子の*in vitro*での滴定に利用できる。これらは、ウエスタン-プロットによる(Ironside J.W. et al., J. of Thrombosis及びHaemostasis, 1, 1479-1486, 2003)またはELISAによるPrP<sup>Sc</sup>の検出からなる。これらの技術は、病原性タンパク質(PrP<sup>Sc</sup>)と正常タンパク質(PrP)との区別のために、分析されるサンプルのプロテイナーゼKによる予備消化、または、カオトロピック剤による変性を必要とする。さらに最近開発された滴定方法は、PrPを認識しないPrP<sup>Sc</sup>に特異的な抗体の使用に基づく。

【0011】

NCTAに結合した感染物の滴定は、他の動物種に感染しているTSEの系統にあらかじめ適応することを許容する、齧歯動物のような、実験動物への、または、感染物の起源と同じ種のPrPを発現するトランスジェニックマウスへの脳内接種により行われる。

【0012】

数人の著者は、診断に使用されることを目的として、*in vivo*及び*in vitro*技術(トランスジェニック細胞培養物の接種)を伴う、免疫-化学技術によるPrP<sup>Sc</sup>による検出限界を比較した。標識されたエピトープPrPを発現するトランスジェニック動物について論じる、米国特許第6 150 583号が、例として引用され得る。

【0013】

古典的なウイルスの場合、感染因子の検出技術は、感染物の*in vitro*及び*in vivo*での滴定のような、直接法により、及び、ポリメラーゼ連鎖反応によるウイルスゲノムの増幅、*in vivo*接種とそれに続く特徴的なウイルス因子と比較したセロコンバージョンの明示、及び、関連する病理学関連マーカーの免疫-化学または分子検出による間接法により行われ得る。

【0014】

間接技術に対する直接技術の評価は、レギュレーションを設定するために、それらの実験的な使用のあらかじめ必要な部分である。このように、関連のあるウイルス間で区別さ

10

20

30

40

50

れ、その *in vitro*での感染物の滴定が立証され（継続的に感受性で、ウイルスの系統に適合する許容状態のセルライン）、モデルウイルスは病原因子と近縁の先祖であり、*in vitro*での増殖は再現可能でない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

現在まで、生物学的産物を獲得する及び精製するプロセスにおいて組み込まれたウイルスの不活化工程、または、材料の汚染除去工程について、NCTAsに関する実験検証は、例えば、実験齧歯動物またはトランスジェニックマウスへの脳内接種により *in vivo*で直接的に、または、PrPscの *in vitro*免疫 - 化学検出により間接的に、行われ得ない。実際、核酸は感染材料に存在せず、そして、PCRは適用され得ない。さらに、異常タンパク質は、特異的な抗体形成を *in vivo*で生じない。ゆえに、モノクローナル抗体を用いる必要がある。

10

【課題を解決するための手段】

【0016】

生物学的産物におけるNCTAの先の検出及び滴定方法の欠点を克服するために、本出願人は驚くべきことに、NCTA挙動の未だ大部分の理解の欠如にもかかわらず、NCTAの複製に耐性であるトランスジェニックセルラインの使用が、このNCTAの滴定方法の開発を許容するというを示した。特に、この滴定方法は、想定されるNCTAの除去に関して、例えば、血漿画分由来のタンパク質、食料、化粧品、または、さらに一般的には環境に有害であるような任意の産物（例えば、動物ミール）のような、生物学的産物を得るまたは処理するプロセスの、有効性の確認の目的のために使用され得る。それはまた、材料の汚染除去手順、例えば、クロマトグラフィーカラムの有効性の評価に適用され得る。

20

【0017】

本発明に従うNCTAの滴定方法の適用は、生物学的マトリクスに存在するNCTAの絶対力価を測定することを許容する。

【0018】

本発明の範囲において、表現「NCTA」は、ヒトにおける家族性または弧発性CJD、クールー疾患または若年層にみられるCJD変異型の原因であるもの、あるいはまた、羊もしくはウシのスクレーピーまたはネコ科動物の海綿状脳症の原因であるもののような、任意のNCTAとして理解されるべきである。

30

【0019】

それゆえ、本発明は、このNCTAによる感染されやすい生物学的産物におけるNCTAの *in vitro*滴定方法に関し、前記NCTAの複製に耐性の安定したトランスジェニックセルラインが生物学的試料と接触し、そして、前記NCTAの複製により、前記生物学的産物に存在する、NCTA量を増幅するために、1以上の継代において培養されることを特徴とする。

【0020】

本発明の実施を可能にする、また、以降で定義される要求及び基準を満たす、特定のトランスジェニックセルラインの選択は、約4ログのスケールで、すなわち、*in vitro*で、1から10000感染ユニットで、NCTAに結合される感染物の定量のための要求を満たすことを許容する。これは、例えば、NCTAsの除去のための生物学的産物を得るプロセスの有効性の検証基準を満たすことを可能にし得る。

40

【0021】

本発明の滴定方法におけるこのようなトランスジェニックセルラインの使用は、複数の利点、特に、生物学的産物に存在するNCTAの定量期間のかなりの減少の利点を有し、本発明の滴定方法の結果は、*in vivo*での参照方法と良好な相間関係がある。典型的に、滴定結果は、約1及び1/2ヶ月以内に得られ、一方、ゴールデンハムスターへの脳内 *in vivo*接種による先行技術のそれらは、最も好ましい場合に、一年以内に、

50

そして動物の（感染された／非感染の）状態を明らかにするために、退屈で補足的な組織病理学検査という犠牲を払って、もたらされる。さらに、これらのセルラインは、滴定測定を増幅可能で、再現可能な応答、及び、免疫 - 化学により明らかにされない N C T A の感染力の実証を提供する。非常に多数の動物を使用する実験及びそれらの安楽死を回避するという利点も有する。

【 0 0 2 2 】

本発明の実施を許容するこのような安定したトランスジェニック細胞は、以下の要求及び基準を満たす。

【 0 0 2 3 】

神経細胞（ニューロン、樹状細胞）は、*in vitro*での培養へのそれらの低い適応のために、*in vitro*滴定の目的において、必ずしも、トランスジェネシスのための最良の材料ではなく、トランスジェニックセルラインは、既知の技術により、N C T A の複製のための理想的な環境を提供するために必要な、特定のタイプの細胞と特定のトランスジーンとの組み合わせにより作られる。

10

【 0 0 2 4 】

Vilette et al. (PNAS, March 2001, 98(7), 4055-4059) は、羊の P r P (トランスジーン) を発現するトランスジェニック及び安定ウサギ上皮細胞が、羊の P r P s c を含む抽出物による感染によって、羊 P r P s c を複製でき得るということを示した。これらの著者は細胞モデル、R o v 9 ラインを設計し、これは誘導様式で外来性 P r P を発現し、感染材料と接触したこれらの細胞内での P r P s c の蓄積に必要な培養期間中、その保存を確実にする。N C T A の複製に耐性のこのような安定したトランスジェニック細胞は、本発明の滴定方法において使用可能である。

20

【 0 0 2 5 】

Archer et al., (Journal of Virology, Jan. 2004, p. 482-490) は、P r P s c の複製に耐性である安定したセルラインの種々のタイプを設計した。これらのモデルは、羊 P r P を発現し、そして、羊 P r P s c の複製に耐性のマウスグリア細胞、M o v S 細胞からなる。これらの細胞は、本発明の滴定方法に特に好適であると証明された。

【 0 0 2 6 】

あるものはまた、N C T A の *in vitro* 滴定のための基質 (substrate) として有利に使用されるトランスジェニックセルラインのほかの基準を要求する。これらの基準は、以下である：

30

- 細胞の複製または増殖速度と、感染された細胞における P r P s c の増加を示すために必要な培養期間との間の妥当性；
- 感染因子と接触された後の細胞の安定性、これは、該細胞内の P r P s c の蓄積の細胞毒性の欠如により示され得る；
- 感染に対するそれらの良好な感受性、例えば、感染因子に暴露された細胞内の P r P s c の蓄積を得るための弱い感染重複。

【 0 0 2 7 】

本発明に従うと、N C T A の複製に耐性の安定したトランスジェニック細胞は、この N C T A で、または、標準材料として該 N C T A を含む感染材料で、感染されることが可能な生物学的産物と、それ自体既知の方法により、接触させる。本発明の範囲において、感染材料が、N C T A で感染させた、特に、羊または牛のような、動物の脳抽出物由来の生物学的感染材料である。

40

【 0 0 2 8 】

のちに、該細胞は、該 N C T A の複製を可能にするために、1 以上の継代で培養される。一つの「継代」は、一つの培養ディッシュから得られる細胞画分の、新鮮な培養メディアウムを含む別の培養ディッシュへのプレーティングからなる。ゆえに、各継代は、さらなる分裂のスペースのない細胞の、他のディッシュへの希釈を可能にし、そして、1 つのディッシュにおける培養期間は、N C T A の複製を可能にする。

【 0 0 2 9 】

50

有利に及び本発明に従うと、トランスジェニック細胞は、生物学的に許容可能な水溶液において、該NCTAによる感染されることが可能な生物学的産物の少なくとも一つの希釈物、詳細には幾つかの希釈物、最も詳細には一連の、または、連続した希釈物に接触され得る。このような希釈物は、試験される試料における感染物の定量をさらに正確に行うことを可能にする。トランスジェニック細胞の数回の複製物は、生物学的産物の同じ希釈物と接触され得る。

【0030】

有利には、NCTAは、詳細には当業者に知られた免疫化学方法により、特にウエスタン-ブロットまたはELISAにより、各希釈物について検出される。当業者に知られた任意の技術による、生物学的産物で潜在的に感染させた安定したトランスジェニック細胞の培養工程は、NCTAの複製のために、すなわち、NCTA量の増幅のために必要とされており、これは古典的な方法(ELISA、ウエスタン-ブロット)により検出されるには不十分である。

【0031】

特に、本発明の方法により滴定されたNCTAは、病原性の羊、牛またはヒトのプリオンタンパク質PrP<sup>sc</sup>である。

【0032】

異なる希釈物及び異なる複製物についてのウエスタン-ブロットの全体的な結果は、例えば、スピアマンカルバ(Spearman Karber)(Schmidt N. J., Emmous R. W., Diagnostic Procedures for viral, rickettsial and chlamydial Infection, 1989, 6<sup>th</sup> Edition)のような、感染力価を確立することを可能にする当業者に知られた統計方法により分析され得る。

【0033】

有利には、安定したトランスジェニック細胞は、ウサギ上皮細胞、特にRov9ラインのウサギ上皮細胞(Viletta et al.)またはマウスグリア細胞、特に、MovS6ラインのマウスグリア細胞(Archer et al.)である。

【0034】

有利には、NCTAにより汚染されることが可能な生物学的産物は、血液産物及びそれらの製剤、食料、化粧品、及び、環境に害をもたらす任意の産物からなる群から選択される。

【0035】

本発明はまた、伝達性非通常型因子(NCTA)で汚染されることが可能な生物学的産物を得る及び処理するプロセスの*in vitro*評価及び/または制御方法への、本発明の滴定方法の適用に関する。この評価及び/または制御方法は、生物学的産物が、あらかじめ記載したような、本発明の滴定方法を、前記プロセスの上流及び下流で受け、及び、二つの得られた力価の値を比較するという特徴を有する。二つの測定結果の比較により、NCTAの除去程度または減少ファクターが決定される。

【0036】

特に、本発明の滴定方法は、例えば、クロマトグラフィーまたはナノ濾過、特に特許EP 0 359 593及び特許出願WO 0 209 2632に記載されるクロマトグラフィーを使用して、生物学的産物、特に、血液製剤のような血液産物を得るまたは精製するための任意のタイプのプロセスに容易に適用される能力を有する。

【0037】

このように、本発明に従う滴定方法を実施することは、試験されるNCTAを含む感染性のまたは潜在的に感染性の材料と接触したNCTAの複製を高める特定のトランスジェニックセルラインを使用する滴定のおかげで、NCTAの除去のための、NCTAで汚染されることが可能な任意の生物学的産物の製造または処理または精製のプロセス(またはプロセスの一部)の有効性を評価すること及び/または制御することを可能にする。NCTAの量は、該プロセス(またはプロセスの一部)の上流及び下流で測定され、NCTAに関するその有効性が評価される。両者の測定値を比較することにより、病原因子除去

10

20

30

40

50

の程度が決定される。このように、本方法は、生物学的産物を得るプロセスのうちに、または、生物学的産物を得ることが続くNCTAの除去処理の範囲において、行われ得る。

【0038】

本発明はまた、本発明の滴定方法の、材料汚染除去手順の*in vitro*評価及び/または制御方法への適用に関する。この場合、NCTAを含む生物学的産物のNCTA力価は、本発明の滴定方法により測定される。続いて、この感染された生物学的産物は、汚染除去される該材料と接触させ、そして、この材料は汚染除去手順を受ける。最終的に、生物学的産物の力価が（これは汚染除去手順に供された）、再度測定される。汚染除去手順の上流及び下流で行われた両者の力価測定値は、汚染除去手順の有効性を評価するために比較される。

10

【0039】

NCTAを含む生物学的産物は、例えば、牛または羊のような、NCTAで感染された動物の脳の抽出物に由来する。

【0040】

該材料は、精製のため、特に、クロマトグラフィー用のカラムに使用される材料であり得る。

【0041】

該汚染除去手順は、例えば、ソーダでクロマトグラフィー用のカラムを清浄にすることであり得る。

【実施例】

20

【0042】

実施例1：細胞培養物によりNCTAsに結合される感染性の滴定

MCTAsに結合される感染性の*in vitro*滴定システムの実行可能性試験のために、MovS6細胞（Archer F. et al. 2004）は、NCTAsの複製に耐性の細胞として選択され、トランスジェニックマウスTg301に適する系統スクレーパーPG127は、感染源として使用した（Vilotte JL et al.. Journal of Virology, Vol. 75, n 13, p. 5977-5984, 2001）。生物学的に許容される接種物は、100mg/mlに感染されたマウスの脳ホモジネートであった。該細胞は、グルタミン及びウシ胎児血清で補完したDMEM + EamF - 12メディウムで培養した。滴定プレートは、接種前24時間に調製した。該細胞は、96ウェルのサイズにおいては、ウェルあたり40,000細胞の（実験n 1）、24ウェルのプレートにおいて100,000細胞の（実験n 2及び3）の割合で接種した。マウスの脳ホモジネートの連続的な希釈物は培養メディウムで調製し、希釈工程は、10において10（実験n 1及びn 2）、または、5において5（実験n 3）であった。接種物の各希釈物において、培養プレートの5ウェルに感染させた。該細胞は、12時間から4日間の期間、特定量の接種物（50から150µl）と接触させた。表1に、実験毎に特異的な接種及び拡大の実験条件を要約する。感染させた細胞の半分（実験n 1）または全部（実験n 2及び3）を維持するために、プレートサイズを変化させる間、該接種物を捨て、そして、新鮮な培養メディウムで置き換え、その後、該細胞は最初の継代まで培養物中で維持する。細胞培養の続行において、培養メディウムは週に1回変え、そして、各継代で細胞の90%を分析することを可能にするように、該細胞を1から10の割合でプレートアウトした。各継代で回収した細胞は、細胞ペレットの形態で凍結し、PrPscを検出するためにウエスタンブロット法による分析にかけるまで、-80で保持した。各細胞ペレットを、50µlの量ベンゾナーゼ（Benzonase）（250ユニット）で、37で2時間処理した。そして、細胞溶解物をプロテイナーゼKで処理し、変性させ、そして、変性条件下でポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS - PAGE）により分析した。ゲル中で移動したタンパク質を、エレクトロトランスファーにより、ニトロセルロース膜上に移した。該膜上に存在するPrPscは、抗体6H4と（Prionocs）、そして、二次標識抗体（マウス抗体を標的とするヤギ抗体）とインキュベートすることにより検出する。標識された膜は、化学発光により現される。グリコシル化PrPscの3つの形態の電気泳動プロフィールがオートラジオグラフィーで

30

40

50

みられる時、試料は陽性と考える。ウエスタンブロットによる各分析において、陰性コントロール（M o v S 6 細胞を感染させていない）は、試料で処理した。各細胞継代について、培養プレートの全体のウェルを試験した。作成した接種物の希釈物を接種した細胞培養物の全部の複製物が、2つの連続的な継代の間の P r P s c において陽性である場合、これらの培養物は、次の継代でそれ以上試験しなかった。試料の力価は、スピアマンカルバ法により、最後の細胞培養物で算出した（Schmidt NJ and Emmons R.W. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection 1989, 6th Edition）。

【 0 0 4 3 】

【表 1】

表1 NCTAsに結合される感染性の *in vitro* 滴定実験の実験条件

10

パラメーター	実験n <sup>○</sup> 1	実験n <sup>○</sup> 2	実験n <sup>○</sup> 3
接種のための培養プレートサイズ	マイクロプレート 96ウェル	プレート 24ウェル	プレート 24ウェル
接種する細胞の密度 (Cells/well)	40 000	100 000	100 000
接種物の容量 ( $\mu$ l)	50	1100 (新鮮なメディウム 1mlに希釈した 100 $\mu$ l)	150
最初の接触の時間 (時)	12	96	34
新鮮なメディウムの添加 (ml)	0, 2	1 (捨てられた接種物)	1
二次培養 (時)	希釈接種物存在下で 48時間、そして、 新鮮なメディウムで 48	24	72
最初の継代でプレートアウトした細胞の比率 (プレートサイズ6ウェルの変化)	50 %	100 %	100 %

20

30

40

【 0 0 4 4 】

結果

実験 n 1

系統スクレイピーPG127で感染させた試験したマウス脳ホモジネートの希釈は、1

50

$10^{-1}$  から  $10^{-6}$  であった。継代 n 3 において、細胞培養ウェルに PrPsc の存在はみられなかった。継代 n 4 において、接種物の  $10^{-1}$  から  $10^{-3}$  からの希釈で感染させたウェルの 100% が PrPsc について陽性であり、そして、接種物の  $10^{-4}$  の希釈で感染させた培養物の 75% が陽性であった。継代 n 5 において、 $10^{-5}$  の希釈で感染させたウェルの 25% は陽性であり、スピアマンカルバ法に従う 1 ml あたりの 50% (TCID<sub>50</sub>) 感染用量の 6, 05 ログの力価を確立することに成功した。続く細胞継代において、ストック力価の増加は示さなかった。

#### 実験 n 2

表 2 は、実験 n 2 において得られた結果の要約であり、そして、接種物の各希釈 ( $10^{-3}$  から  $10^{-7}$ ) で感染させた各培養複製物の陽性比率の変化 (evolution) を再び示すことができる。培養物における PrPsc の出現の時間は、該培養物が接種された感染用量に反比例するというを示し得る。このように、接種物の  $10^{-3}$  の希釈で接種された培養物は継代 n 2 から PrPsc を示し、一方、さらなる継代は、希釈  $10^{-4}$  を受けた培養物の 100% が陽性であるということを観察するためのに待つ必要があった。この実験における接種物の算出した力価は、5, 5 TCID<sub>50</sub> / ml であった。

【0045】

【表 2】

表 2 滴定実験 n<sup>o</sup>2 の結果

継代 n <sup>o</sup>	接種した希釈物に続く感染培養物の数 (感染したウェル/接種したウェル)						力価 (ログ TCID <sub>50</sub> /ml)
	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	ネガティブ コントロール	
1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0
2	5/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4, 7
3	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5, 5
4	NT	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5, 5
5	NT	NT	0/5	0/5	0/5	0/5	5, 5
6	NT	NT	0/5	0/5	0/5	0/5	5, 5

NT=2つの先の継代で100%陽性のため、試験せず。

【0046】

#### 実験 n 3

表 3 は、実験 n 3 において得られた結果の要約である。この実験において、接種物の希釈工程は、1/5 に減少され、そして、試験した希釈は、 $10^{-4}$  から  $10^{-6}$ 、 $10^{-8}$  であった。最も高い力価は、継代 n 6 において得られ、そして、算出力価は 6, 43 TCID<sub>50</sub> / ml であった。

【0047】

【表 3】

表3 実験n<sup>o</sup>3の結果

継代 n <sup>o</sup>	接種した希釈物に続く感染培養物の数 (感染したウェル/接種したウェル)						力価 (ログTCID <sub>50</sub> /ml)
	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4,7</sup>	10 <sup>-5,4</sup>	10 <sup>-6,1</sup>	10 <sup>-6,8</sup>	ネガティブ コントロール	
1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0
2	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3,4
3	5/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5,6
4	5/5	5/5	3/5	0/5	0/5	0/5	6,3
5	NT	5/5	3/5	0/5	0/5	0/5	6,3
6	NT	NT	4/5	0/5	0/5	0/5	6,4
7	NT	NT	4/5	0/5	0/5	0/5	6,4

NT=2つの先の継代で100%陽性のため、試験せず。

## 【0048】

3つの実験の結果は、TCID<sub>50</sub>で表されるNCTAに結合された感染性の*in vitro*滴定の実行可能性を実証した。細胞培養物を感染することによる通常型のウイルスの*in vitro*滴定と同様に、細胞MovS6は、感染させた細胞におけるPrP<sup>sc</sup>の蓄積を明らかにすること、及び、該細胞の増幅前の接種物において免疫化学技術により検出されないPrP<sup>sc</sup>の量を検出することが可能である。滴定システムの設計された作動条件は、良好な感度を得るために最適化され、ウエスタンブロット技術による接種物における直接PrP<sup>sc</sup>検出のものより高く、そして、これは、4ログより大きいか同等の定量領域を確実にする。異なる実験において得られる結果を比較する場合、細胞の感染様態は、接種物の算出力価へのわずかな影響を与えるが、しかし、一般的に、これらの力価は明瞭であるということに気が付く。実際、実験n<sup>o</sup>2の細胞をカバーする培養メディアの1mlにおける接種物の希釈(100μl)を考慮すると、この滴定は最初の培養物のそれより10倍低い希釈物で行われたということが考えられる。

## 【0049】

これらの実験は、古典的な*in vivo*滴定システム(これは、結果に有意な多数の実験齧歯動物の脳内接種、結果を得るための数ヶ月の期間、及び一般的に、それらの脳の病理学的試験による、または、ウエスタンブロット技術による、接種された動物の感染状態の確認を必要とする)と比較して、NCTAsに結合された感染性の*in vitro*滴定の卓越を実証する。さらに、該システムは実験動物の経験数を例えば細胞培養物に関する代替りの方法の利益に制限する実際のガイダンスに従う。最終的に、提案した方法は、より高価及びより複雑な、P3実験室における限定を要する動物実験とは対照的に、P2実験室において行われ得る。

実施例2: NCTAで汚染されることが可能な生物学的薬剤の精製工程に関連する減少ファクターの算出

この実験において、生物学的産物製造プロセス工程の例として、ナノ濾過工程を選択し

10

20

30

40

50

た。選択されたフィルターは、15 nmの多孔度及び0,01 m<sup>2</sup>の表面のPLANOVA 15 N (ASAHI KASEI)フィルターであった。濾過するために選択した産物は、クエン酸三ナトリウム二水和物緩衝液0,01 M、グリシン0,12 M、L-リシン(モノクロライド)0,016 M、塩化カルシウム二水和物0,001 M、塩化ナトリウム0,17 M、容量オスモル濃度490-510 mosmol/kg、pH6,90-7,10中の、ヒトアルブミン0,2 g/lであった。ナノ濾過は、500 ± 100 mbarの圧力下、25で行った。ヒトアルブミン希釈緩衝液40 mlで、該産物のナノ濾過の前に、該フィルターを平衡にした。系統スクレイピーPG127で感染させたマウス脳のホモジネート4%に実験用に添加した、濾過される産物30 mlの1容量を濾過し、そして、フィルターから該産物を除くために、10 ml量の平衡緩衝液を濾過した。工程の再現性を高めるために、2回のナノ濾過実験を行った。実験用に加えた濾過される産物は、ナノ濾過前に該産物における感染性定量のためのアリコートフラクションを得るに十分な量で調製した。全量40 mlをナノ濾過の上流で回収し、そして、ナノ濾過後の該産物における感染物の量を測定するために滴定した。実験用に添加した出発材料及び濾過産物もなお、それらの滴定を予測して-80で維持する前に、培養メEDIUMに1/3に希釈した。試料は、最初の実施例に記載した実験n 3の実験条件に従って滴定した。残余感染物が見られない、または、このうえなく非常に低いと予測される濾過物の試料に関しては、非細胞毒性試料の最も低い希釈物を10の複製物に、そして続く希釈物を5の複製物同じ物に、あらかじめ上述したように、接種した。

10

## 【0050】

20

表4は、このナノ濾過実験で生じた4つの試料の滴定結果の要約である。

## 【0051】

添加した出発材料の試料は、試験1及び2において、4,67 log TCID<sub>50</sub>/mlの力価を示した。濾過物サンプルにおいて、残余感染物は検出されなかった。これらの試料の負荷は、ポアソンの法則に従い、接種された試料の最も高い希釈物の体積から0,28 log TCID<sub>50</sub>/mlで算出した。試料に存在する全負荷量は、それらの負荷に、それらのそれぞれの体積を乗じることにより算出し、そして、減少ファクターは、ナノ濾過前の、出発材料または初期試料に存在する荷重を、濾過物に存在するそれで割ることにより算出した。実験用の添加物に加えた算出した感染物量から、クリアランスファクターを算出した。クリアランスファクターと減少ファクターにおける差は、1 logより大きい時、該出発産物の、この産物における感染物を検出するための滴定システムの性能への干渉を示すことを許容する。表5は、これらの算出値の要約である。出発材料に添加するために使用した該脳ホモジネートに存在する感染物の除去に関する減少ファクターは、実験1及び2のそれぞれにおいて、4,24及び4,22 logであった。クリアランスファクターの算出は、出発材料のいかなる干渉も示さなかった。

30

## 【0052】

## 【表 4】

表4 ナノろ過工程の評価において発生した試料の滴定結果

試料	最終陽性希釈物	感染した培養物の数/ 接種した培養物の数	力価 (ログTCID <sub>50</sub> /ml)
初期試料 実験1	1/3 125 1/15 625	4/5 1/5	4,67
ろか物 実験1	ピュア	0/10	< 0,28*
初期試料 実験2	1/3 125 1/15 625	3/5 2/5	4,67
ろか物 実験2	ピュア	0/10	< 0,28*

\* 感染物検出されず：ポアソンの法則に従う算出の検出限界

10

20

【 0 0 5 3 】

【表 5】

表5 in vitro 滴定により評価したナノろ過工程15nmに関する  
減少ファクターの算出

試料	力価 (ログ TCID 50/ml)	体積 (ml)	全負荷 (㉮ TCID 50)	クリアランス ファクター (ログ) a	減少ファクター (ログ) b
初期ストック 実験1	6,43	1,21 <sup>c</sup>	6,51		
初期試料 実験1	4,67	30	6,14		
ろか物 実験1	<0,28 <sup>d</sup>	41,9	< 1,9	≥ 4,61	≥4,24
初期ストック 実験2	6,43	1,28 <sup>c</sup>	6,54		
初期試料 実験2	4,67	30	6,14		
ろか物 実験2	< 0,28 <sup>d</sup>	44,3	< 1,92	≥ 4,62	≥4,22

a : 実験用添加物における全負荷からの算出 ;

b : 初期物質において測定した初期負荷からの算出 ;

c : 初期試料の滴定に関して得たアリコートフラクションを考慮した量 ;

d : 感染物検出されず : ポアソンの法則に従う算出の検出限界

10

20

30

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/FR2004/002179
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/50 G01N33/68 G01N33/569		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	VILETTE D ET AL: "Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 98, no. 7, 27 March 2001 (2001-03-27), pages 4055-4059, XP002280772 March 27, 2001 ISSN: 0027-8424	1-12
Y	p.4056, colonne de droite, section : "PrPres detection in Rov9 cells inoculated with sheep scrapie agent" abstract ----- -/--	13-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  27 January 2005		Date of mailing of the international search report  14/02/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Jacques, P

5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/002179

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	SABUNCU ELIFSU ET AL: "PrP polymorphisms tightly control sheep prion replication in cultured cells." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 77, no. 4, February 2003 (2003-02), pages 2696-2700, XP002315297 ISSN: 0022-538X	1-12
Y	p.2696, colonne de droite, Materials and Methods, discloses section "Transmission of sheep prion to Rov cells and PrPsc detection"	13-16
X	LAUDE H ET AL: "New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives" COMPTES RENDUS - BIOLOGIES, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 325, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 49-57, XP004334087 ISSN: 1631-0691	1-12
Y	p. 53, paragraphe 3. à la page 56.	13-16
P,X	ARCHER FABIENNE ET AL: "Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 78, no. 1, January 2004 (2004-01), pages 482-490, XP002315320 ISSN: 0022-538X p. 483, colonne de gauche, Materials and Methods, paragraphe "Infection of cell cultures". abstract	1-12
Y	STENLAND CHRISTOPHER J ET AL: "Partitioning of human and sheep forms of the pathogenic prion protein during the purification of therapeutic proteins from human plasma." TRANSFUSION (BETHESDA), vol. 42, no. 11, November 2002 (2002-11), pages 1497-1500, XP002280769 ISSN: 0041-1132 (ISSN print) abstract	13-16
Y	US 6 605 445 B1 (LEE DOUGLAS C ET AL) 12 August 2003 (2003-08-12) column 2, line 36 - line 39	13-16

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
01/FR2004/002179

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	VEY M ET AL: "Purity of spiking agent affects partitioning of prions in plasma protein purification" BIOLOGICALS, vol. 30, no. 3, September 2002 (2002-09), pages 187-196, XP002280770 ISSN: 1045-1056 abstract p.188, colonne de gauche, 2eme et 3eme paragraphes -----	13-16
A	LAU W ET AL: "Polymerase chain reaction based assessment of leukoreduction efficacy using a cytomegalovirus DNA transfected human T-cell line." JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY: THE OFFICIAL PUBLICATION OF THE PAN AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL VIROLOGY. NETHERLANDS 20 AUG 1998, vol. 11, no. 2, 20 August 1998 (1998-08-20), pages 109-116, XP002280771 ISSN: 1386-6532 abstract -----	1-16
A	MACGREGOR I: "Prion protein and developments in its detection" TRANSFUSION MEDICINE, OXFORD, GB, vol. 11, no. 1, February 2001 (2001-02), pages 3-14, XP002220702 the whole document -----	1-16

### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/002179

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6605445	B1 12-08-2003	US 2003211557 A1	13-11-2003

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2004/002179

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N33/50 G01N33/68 G01N33/569		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
X	VILETTE D ET AL: "Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 98, no. 7, 27 mars 2001 (2001-03-27), pages 4055-4059, XP002280772 March 27, 2001 ISSN: 0027-8424	1-12
Y	p.4056, colonne de droite, section : "PrPres detection in Rov9 cells inoculated with sheep scrapie agent" abrégé ----- -/--	13-16
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités		
*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cite pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *&* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
27 janvier 2005		14/02/2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Jacques, P

5

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2004/002179

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
X	SABUNCU ELIFSU ET AL: "PrP polymorphisms tightly control sheep prion replication in cultured cells." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 77, no. 4, février 2003 (2003-02), pages 2696-2700, XP002315297 ISSN: 0022-538X	1-12
Y	p.2696, colonne de droite, Materials and Methods, discloses section "Transmission of sheep prion to Rov cells and PrPsc detection"	13-16
X	LAUDE H ET AL: "New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives" COMPTES RENDUS - BIOLOGIES, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 325, no. 1, janvier 2002 (2002-01), pages 49-57, XP004334087 ISSN: 1631-0691	1-12
Y	p. 53, paragraphe 3. à la page 56.	13-16
P,X	ARCHER FABIENNE ET AL: "Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 78, no. 1, janvier 2004 (2004-01), pages 482-490, XP002315320 ISSN: 0022-538X p. 483, colonne de gauche, Materials and Methods, paragraphe "Infection of cell cultures". abrégé	1-12
Y	STENLAND CHRISTOPHER J ET AL: "Partitioning of human and sheep forms of the pathogenic prion protein during the purification of therapeutic proteins from human plasma." TRANSFUSION (BETHESDA), vol. 42, no. 11, novembre 2002 (2002-11), pages 1497-1500, XP002280769 ISSN: 0041-1132 (ISSN print) abrégé	13-16
Y	US 6 605 445 B1 (LEE DOUGLAS C ET AL) 12 août 2003 (2003-08-12) colonne 2, ligne 36 - ligne 39	13-16

-/--

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR2004/002179

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
Y	VEY M ET AL: "Purity of spiking agent affects partitioning of prions in plasma protein purification" BIOLOGICALS, vol. 30, no. 3, septembre 2002 (2002-09), pages 187-196, XP002280770 ISSN: 1045-1056 abrégé p.188, colonne de gauche, 2eme et 3eme paragraphes -----	13-16
A	LAU W ET AL: "Polymerase chain reaction based assessment of leukoreduction efficacy using a cytomegalovirus DNA transfected human T-cell line." JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY: THE OFFICIAL PUBLICATION OF THE PAN AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL VIROLOGY. NETHERLANDS 20 AUG 1998, vol. 11, no. 2, 20 août 1998 (1998-08-20), pages 109-116, XP002280771 ISSN: 1386-6532 abrégé -----	1-16
A	MACGREGOR I: "Prion protein and developments in its detection" TRANSFUSION MEDICINE, OXFORD, GB, vol. 11, no. 1, février 2001 (2001-02), pages 3-14, XP002220702 le document en entier -----	1-16

### RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à  membres de familles de brevets

Demande internationale No  
PCT/FR2004/002179

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
US 6605445	B1	12-08-2003	US 2003211557 A1	13-11-2003

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100099988

弁理士 斎藤 健治

(72)発明者 オウビン ジャン - ティエリ

フランス国 エフ - 7 5 0 0 3 パリ ル デ ラ コールドゥリウ 1 4

(72)発明者 フラン ブノワ

フランス国 エフ - 9 1 4 7 0 リムール アレ デ ヴェイヨット 7 レズィダンス レ エ  
ウト デュ パルク

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QA20 QQ02 QQ08 QQ16 QQ79 QQ91 QR16 QR48

QR51 QR56 QR77 QR80 QS24 QS33 QX02

专利名称(译)	NCTAの体外滴定方法及其在评估和/或监测生物制品生产方法中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007503209A</a>	公开(公告)日	2007-02-22
申请号	JP2006524391	申请日	2004-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	法国血液分割暨生化制品实验室		
申请(专利权)人(译)	LABORATOIRES 捻, 法语, 杜, Furakushonuman等, 德, 生物技术		
[标]发明人	オウビンジャンティエリ フランブノワ		
发明人	オウビン ジャン-ティエリ フラン ブノワ		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/53 G01N30/88 G01N33/50 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/5008 G01N33/502 G01N33/56983 G01N33/6896		
FI分类号	C12Q1/02 G01N33/53.D G01N30/88.J		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ16 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR56 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS33 4B063/QX02		
代理人(译)	斋藤健治		
优先权	2003010126 2003-08-25 FR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供使用转基因细胞系体外滴定异常类型转移因子 (NCTA) 的方法。本发明还涉及：生物制品的有效性体外评价和/或方法或前述的体外滴定法用于监控的处理方法，或一个或多个步骤应用到这样一个过程用于去除NCTA的，和净化程序的在其应用于体外评估和/或监测的方法。

パラメーター	実験 n°1	実験 n°2	実験 n°3
接種のための培養プレートサイズ	マイクロプレート 96 ウェル	プレート 24 ウェル	プレート 24 ウェル
接種する細胞の密度 (Cells/well)	40 000	100 000	100 000
接種物の容量 (μl)	50	1100 (新鮮なメディアム 1 ml に希釈した 100 μl)	150
最初の接触の時間 (時)	12	96	34
新鮮なメディアムの添加 (ml)	0,2	1 (捨てられた接種物)	1
二次培養 (時)	希釈接種物存在下で 48時間、そして、 新鮮なメディアムで 48	24	72
最初の継代でプレートアウトした細胞の比率 (プレートサイズ6ウェルの変化)	50 %	100 %	100 %