



NO 905.582

CLASSIF. INTERNAT.: C12Q - A61B

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

MIS EN LECTURE LE: 9 Avril 1987

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention

Vu le procès-verbal dressé le 9 Octobre 1986 A 14h 30

à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : PROVINCE DE BRABANT INSTITUT PASTEUR  
642 rue Engeland, B-1180 Bruxelles(BELGIQUE)

REPR. PAR FREYLINGER ET ASSOCIES - LIEGE  
un brevet d'invention pour PROCEDE DE PRODUCTION ET DE PURIFICATION D'ANTIGENES  
PROTEIQUES DE MYCOBACTERIUM BOVIS-BCG, PRODUITS OBTENUES ET LEURS APPLICATIONS.

ARTICLE 2.- Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention (mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de sa demande de brevet.

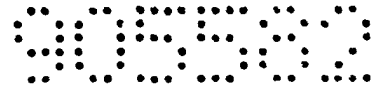
Bruxelles, le 9 Avril 1987

PAR DELEGATION SPECIALE

L' Inspecteur général



L. VERJÉS



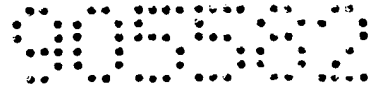
BREVET D'INVENTION

Au nom de : PROVINCE DE BRABANT  
Institut PASTEUR

à B-1180 BRUXELLES

Pour : PROCEDE DE PRODUCTION ET DE PURIFICATION  
D'ANTIGENES PROTEIQUES DE MYCOBACTERIUM  
BOVIS-BCG, PRODUITS OBTENUS ET LEURS  
APPLICATIONS.

Priorité : //



PROCÉDÉ DE PRODUCTION ET DE PURIFICATION D'ANTIGÈNES  
PROTÉIQUES DE MYCOBACTERIUM  
BOVIS-BCG, PRODUITS OBTENUS ET LEURS APPLICATIONS.

05 Objet de l'invention

La présente invention concerne un procédé de production et de purification d'antigènes protéiques de Mycobacterium Bovis-BCG. Elle s'étend à différents anti-  
10 gènes de Mycobacterium Bovis-BCG pouvant être obtenus par ce procédé ainsi qu'aux applications, en particulier dans des tests de diagnostic de la tuberculose.

Brève description de l'état de la technique

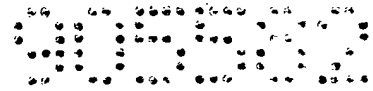
15

Les techniques de culture carencée en zinc du BCG ont été décrites dans le "Journal of General Microbiology (1981) 124, 353-357".

Alors que le BCG croît sur le milieu Sauton normal en formant un voile qui atteint son développement maximum après 14 jours, si lors de la préparation du milieu Sauton - milieu synthétique simple - l'addition des ions zinc est omise selon la technique décrite, le BCG pousse mal, le voile sombre après 8 à 9 jours et le rendement poids sec de la culture après 14 jours est 4 à 5  
20 fois inférieur à celui d'une culture normale; les bactéries toutefois sont toujours alcool-acido résistantes.

Ce milieu est 2 à 3 fois plus riche en protéines et en aldéhydes qu'un milieu de culture normal.

De plus, il y apparaît une classe de protéines précipitables à pH 4,5, de telles protéines sont à peine détectables dans les conditions de culture normale. Pour obtenir cet effet de carence en zinc sur les cultures de BCG, il est indispensable d'utiliser pour la préparation  
30 de milieu Sauton une eau distillée de résistivité égale ou supérieure à  $10^6$  ohms.cm; il faut également que la verrerie en pyrex utilisée soit soigneusement rincée avec une eau de même résistivité.



## Élément caractéristique de l'invention

On s'est aperçu qu'il est possible d'améliorer la quantité d'antigènes qui est libérée dans de tels fil-  
05 trats de culture carencé par l'addition lors de la pré-  
paration du milieu, d'une quantité de zinc égale à 10%  
de la quantité usuellement additionnée au milieu Sauton,  
soit 0,1425 mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  par litre de milieu (au  
lieu de 1,425 mg). Ceci conduit au développement plus  
10 important d'un "voile anormal" avec libération accrue de  
protéines dans le milieu; dans ces conditions la récolte  
peut prendre place après 21 jours au lieu de 14 jours.

Ces filtrats de culture constituent un excellent  
matériel de départ pour l'isolement d'antigènes de sur-  
15 face et extracytoplasmiques, non seulement du BCG, mais  
aussi de différentes espèces de mycobactéries (souches  
humaines, bovines, aviaires et atypiques) et l'effet de  
carence en zinc peut être étendu à d'autres espèces de  
bactéries à croissance lente.

20

### Techniques de purification d'antigènes spécifiques

À partir de tels filtrats de culture carencée, il  
est possible de préparer des antigènes caractéristiques  
25 de l'invention.

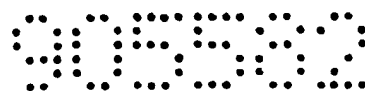
La purification des antigènes de *Mycobacterium*  
*Bovis*-BCG (Souche 1173 P2) est obtenue par chromatogra-  
phies successives sur Phénylsepharose, DEAE Sephacel et  
filtration moléculaire sur Sephadex (les termes SEPHARO-  
30 SE, SEPHACEL et SEPHADEX sont des marques).

#### Première étape

Récolte des filtrats de culture carencée en zinc  
et fixation de ce milieu sur colonne de phénylsépharose.

35

Les milieux de culture sont rassemblés et la plu-  
part des bactéries sont éliminées par décantation.



Le milieu est alors filtré sur une unité Millipak 100 (porosité  $0.22 \mu\text{m}$ ) - (Millipore).

À 4 l de milieu contenant environ 600 mg de protéines, on ajoute du phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pour atteindre une concentration 0,02 M, et du chlorure de sodium, pour atteindre une concentration 0,45M; le Tween 80 et EDTA sont ajoutés pour obtenir respectivement une concentration 0,005% P/V et  $10^{-3}$  M finales. (Tween est une marque).

Le pH est ajusté à pH 7,3 avec de l'acide chlorhydrique 5N. Tous les tampons utilisés dans la purification sont ajustés à pH 7,3 et contiennent du Tween 80 0,005% P/V; ils ont été stérilisés par autoclavage à  $120^\circ$  pendant 20 minutes. Toutes les opérations qui suivent se font à  $+4^\circ\text{C}$ .

Le milieu est appliqué sur une colonne de phénylsépharose de la société suédoise Pharmacia 5 x 16 cm équilibré par 600 ml de tampon phosphate 0,02 M contenant du chlorure de sodium 0,45 M et de l'EDTA  $10^{-3}$  M.

#### Deuxième étape

#### Lavage et élution de la colonne de phénylsépharose.

Le débit est de 800 ml par heure. Le gel est lavé par environ 600 ml du même tampon pour éliminer les protéines non fixées, et puis successivement par 800 ml des tampons phosphates 0,02 M et 0,004 M et finalement avec le même volume d'éthanol 10% V/V. La fraction éluée avec le tampon phosphate 0.004 M contient la protéine - P<sub>64</sub> - de poids moléculaire 64.000 en conditions dénaturantes et la fraction éluée par l'éthanol 10% V/V la protéine de poids moléculaire 32.000, P<sub>32</sub>.

Chaque éluat est filtré sur une unité Sterivex GS (porosité  $0.22 \mu\text{m}$  - Millipore). (STERIVEX et MILLIPORE sont des marques).

### Troisième étape

#### Fixation des échantillons contenant la P<sub>32</sub> et la P<sub>64</sub> sur colonnes DEAE et élution de ces protéines.

Aux deux fractions contenant la P<sub>32</sub> et la P<sub>64</sub> du  
05 tampon phosphate est ajouté pour atteindre respective-  
ment les concentrations 0,004 M et 0,02 M et de l'EDTA  
pour atteindre une concentration 10<sup>-4</sup> M finale.

Les solutions protéiques sont alors appliquées  
sur des colonnes de DEAE sephacel (5 x 5 cm) équilibrées  
10 l'une par 500 ml de tampon phosphate 0,004 M EDTA 10<sup>-4</sup> M  
(P<sub>32</sub>) et l'autre par 500 ml de tampon phosphate 0.02 M  
EDTA 10<sup>-4</sup> M (P<sub>64</sub>).

La P<sub>32</sub> est éluée par 600 ml de tampon phosphate  
0,025 M, toutes les fraction du seul pic obtenu sont  
15 rassemblées et concentrées dans un appareil Amicon (AMI-  
CON est une marque) sous 1 kg/cm<sup>2</sup> de pression d'azote  
sur une membrane Amicon PM10.

La P<sub>64</sub> est éluée par 2 l d'un gradient phosphate  
s'étalant de 0,02 M à 0,12 M; les fractions du pic obte-  
20 nu sont analysées en électrophorèse en conditions déna-  
turantes (SDS) et les fractions purifiées sont rassem-  
blées et concentrées dans les mêmes conditions que pour  
la P<sub>32</sub>.

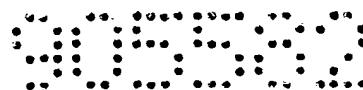
### 25 Quatrième étape

#### Filtration moléculaire.

Les échantillons ainsi concentrés de P<sub>32</sub> et de  
P<sub>64</sub> sont soumis à une filtration moléculaire sur Sepha-  
dex G100 (P<sub>32</sub>) et G200 (P<sub>64</sub>) (2,5 x 40 cm) - à un débit  
30 de 12 ml/par heure.

Les deux protéines ainsi purifiées sont homogènes  
sur la base de 3 critères

- une bande en électrophorèse en conditions dénaturantes  
(dodécylsulfate de sodium - SDS),
- 35 - un pic en filtration moléculaire,
- une ligne de précipitation en contre-immunoelectropho-  
rèse (CIE).



Ces protéines sont des constituants des cellules de BCG ayant cru en conditions normales; elles sont présentées dans les extraits cellulaires solubles.

05 **Caractéristiques physico-chimiques et chimiques des protéines isolées**

A. Poids moléculaire

Technique	Électrophorèse en conditions dénaturantes	Électrophorèse à l'équilibre en gradient d'acrylamide 4% - 30%	Filtration moléculaire sur Sephadex G200
Matériel			
P <sub>32</sub>	32.000	/	32.000
P <sub>64</sub>	64.000	111.800	256.000

20

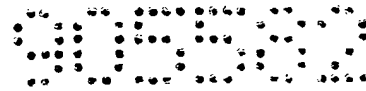
B. La composition en acides aminés de ces protéines est reprise dans le tableau ci-dessous

ACIDE AMINÉ	P <sub>64</sub> (PM 64.000)	P <sub>32</sub> (PM 32.000)
	RÉSIDUS PAR MOLÉCULE	
Lys	46,7	11,0
His	3,8	4,1
Arg	25	8,3
Asp	57,4	34,0
Thr	35,9	12,7
Ser	21,1	21,4
Glu	82,6	27,1
Pro	20,5	25,5
Gly	64,4	40,8

25

30

35



		6	
	Ala	82,9	32,1
	Demi-Cys	--	1,2
	Val	54,7	15,2
	Met	5,6	7,8
05	Ile	27,7	6,0
	Lev	62,4	26,9
	Tyr	8,4	12,2
	Phe	9,6	12,2
	Try	--	4,9
10	Résidus totaux	609,7	303,4
	Index de polarité	44,7%	39,1%

À remarquer l'abondance en acides aminés acides  
15 dans ces deux protéines, le rapport des acides gluta-  
mique et aspartique sur les acides aminés basiques ly-  
sine et arginine est 1,85 pour P<sub>64</sub> et 2,6 pour P<sub>32</sub>.

À noter aussi l'absence de cystéine et de trypto-  
20 phane dans la P<sub>64</sub>.

### C. Spectre ultra violet

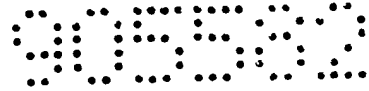
Le spectre U.V. de la P<sub>32</sub> correspond au spectre  
classique des protéines. Son absorption à 280 nm est  
très élevée dans le cas d'une solution à 1 mg/ml dans du  
25 tampon phosphate 0,05 M pH 7,3 contenant du Tween 80 0,005%, 3,59.

La P<sub>64</sub> présente un spectre anormal, avec une ab-  
sorbance un peu élevée à 340 nm et un rapport d'absorbance A  
280/A 260 de 1,05 (ce rapport est de 1,7 pour la P<sub>32</sub>).

Une solution de P<sub>64</sub> à 1 mg/ml dans le même tampon  
30 que celui décrit pour la P<sub>32</sub> donne une absorbance à 280  
nm de 0,39 (voir graphique annexé).

Le dosage des protéines est effectué par la mé-  
thode au Bleu de Coomassie (Réf. Spector, TH. Analytical  
Biochemistry 1978, 86, 142 - 146), la sérum albumine  
35 bovine est utilisée comme standard.

Ces spectres sont repris dans la figure unique  
annexée.



#### D. Présence du sucre

Le contenu en sucre déterminé par le test phénol acide sulfurique est de 1,4% pour la P<sub>32</sub> et égal ou inférieur à 0,3% pour la P<sub>64</sub>.

05

#### Propriétés biologiques des protéines

A. Ces deux protéines sont des antigènes de Mycobacterium Bovis-BCG. Elles ont été identifiées par Morton Harboe dans son système de référence du BCG : la P<sub>32</sub> est l'antigène 85.A., la P<sub>64</sub> est l'antigène 82.

Des antigènes proches ou identiques aux 2 protéines isolées sont présents chez d'autres souches bovines, et chez des souches humaines telle la bacille de KOCH - agent de la tuberculose.

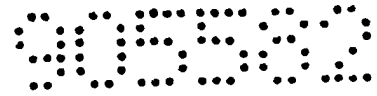
B. Ces deux protéines sont immunogènes - en effet, injectées à l'animal soit à l'état pur soit dans des mélanges complexes elles provoquent la formation d'anticorps dirigés contre elles.

Plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre la P<sub>64</sub> ont été préparés et peuvent être utilisés. L'anticorps monoclonal IV C<sub>7</sub> a une affinité élevée pour la P<sub>64</sub>.

Cet anticorps monoclonal a donné une réaction immunohistochimique positive sur des biopsies de poumon de patients tuberculeux (dans environ 10 cas testés). Les coupes pulmonaires de patients non tuberculeux n'ont pas donné de réaction (également environ 10 cas testés).

#### 30 Activité tuberculitique

Les deux protéines relèvent l'hypersensibilité différée chez des cobayes préalablement sensibilisés soit avec du BCG vivant (1 mg poids humide contenant entre 4 et 8.10<sup>6</sup> cellules par cobaye pesant entre 300 et 500 g), soit avec du BCG tué (2 mg poids humide dans 0,5 ml d'ajuvant incomplet de Freund).



La P<sub>64</sub> relève 50 à 100 x plus efficacement l'hypersensibilité différée que la P<sub>32</sub>.

Son activité par mg de protéine est de l'ordre de 40% de celle de 1 mg de PPD lyophilisée.

05 La mesure de l'activité tuberculinique, in vivo, consiste en la mesure du diamètre de l'induration produite 24 heures après l'injection en intradermique du produit à tester par rapport à la PPD lyophilisée (exprimée en poids) utilisée comme référence (PPD =  
10 Purified Protein Derivative).

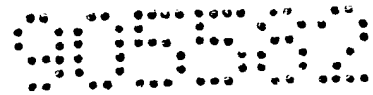
Les résultats d'une expérience type sur cobaye sont repris dans le tableau ci-dessous.

15 Activité des protéines purifiées mesurées par rapport à la PPD et exprimées en pour cent.

Matériel testé	Mode de sensibilisation des cobayes		
	P <sub>32</sub> /PPD BCG	P <sub>64</sub> /PPD BCG	P <sub>32</sub> / P <sub>64</sub>
BCG Vivant	0,6 (0,03-14)	36 (11-117)	2 (0,1-23)
BCG Tué	0,5 (0,01-16)	44 (13-150)	1,1 (0,05-22)

35

Les valeurs entre parenthèses représentent



les limites de confiance à  $p = 0,05$ .

### Induction de l'interferon $\gamma$

05 La protéine P<sub>32</sub> induit la production d'interferon  $\gamma$  in vitro dans des cultures de cellules de rate provenant de souris sensibilisées par du BCG souche GL<sub>2</sub>.

Les souris sont sensibilisées par injection intraveineuse de BCG ayant cru en voile sur du milieu Sauton.  
10 ton.

La dose injectée par souris est de 0,2 ml d'une suspension contenant  $2,5 \cdot 10^6$  bactéries vivantes (C.F.U. - colony forming unit). Après une à quatre semaines les souris sont sacrifiées, les cellules de la rate, en suspension dans du milieu R.P.M.I. 1640 contenant 10% de sérum de veau foetal inactivé, sont distribuées dans des plaques pour microcultures en présence soit des antigènes à tester, soit de la PPD utilisée comme référence.  
15

L'unité d'interferon est définie ici comme la réciproque de la dernière dilution du surnageant de culture qui donne 50% de protection de la lyse de la lignée cellulaire L 929 infectée par le virus V.S.V.  
20

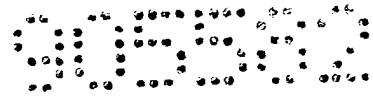
Les résultats d'une expérience type sont repris dans le tableau ci-dessous.

25 Les chiffres du tableau sont des unités d'interferon par ml de surnageant de culture. Ils peuvent être transformés en unités internationales.

30

	PPD exprimée en $\mu\text{m/ml}$			P <sub>32</sub> exprimée en $\mu\text{g/ml}$		
	50	10	2	50	10	2
J + 1	28,5	14	> 6	8,5	8,5	6
35 J + 2	68	40	10	28,5	12	8,5
J + 3	95	81	14	48	34	10

*S*



## Applications des antigènes purifiés

Les antigènes protéiques purifiés, les anticorps polyclonaux dressés contre elles, les anticorps monoclonaux dressés contre la P<sub>64</sub>, et ultérieurement les anticorps monoclonaux dressés contre la P<sub>32</sub> et les peptides issus par hydrolyse des protéines peuvent être utilisés dans différents tests de diagnostic rapide de la tuberculose : ELISA, RIA, Immunoliposomes, Immunohistochimie, pour la détection d'anticorps et d'antigènes dans les échantillons cliniques, sérums, expectorations, lavages, bronchoalvéolaires et biopsies.

Les antigènes protéiques et anticorps polyclonaux ou monoclonaux réactifs peuvent être présentés sous formes de trousse (kits) de détection.

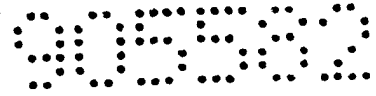
Des peptides issus par hydrolyse des protéines P<sub>64</sub> et P<sub>32</sub>, et des anticorps monoclonaux dirigés contre ces peptides testés (sur modèle animal) comme spécifiques des souches de mycobactéries bovines et humaines permettraient d'améliorer le diagnostic de la tuberculose et d'exclure les infections par mycobactéries d'origine aviaire ou par des mycobactéries atypiques.

Des peptides issus par hydrolyse de la protéine P<sub>64</sub> et présentant des activités tuberculiques pourraient éventuellement servir de standard de référence en lieu et place des PPD bovines et humaines.

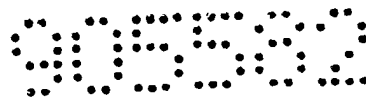
Un exemple de production d'anticorps est donné ci-dessous.

Des souris BALB/c sont immunisées au moyen d'un mélange contenant 15 µg de protéines partiellement purifiées (P<sub>64</sub> ou P<sub>32</sub>) et  $2 \times 10^9$  Bordetella pertussis tuées par la chaleur et adsorbées sur phosphate d'aluminium. Elles reçoivent 2 injections intrapéritonéales de ce mélange espacées par un intervalle d'au moins 1 mois. L'immunisation est contrôlée par la recherche des anticorps par ELISA une semaine après la deuxième injection. Sept jours plus tard, les souris reçoivent par voire in-

traveineuse 2  $\mu$ g de protéines purifiées. Après 3 jours elles sont sacrifiées et leur rate est prélevée. Les splénocytes sont alors fusionnés avec des cellules de myélome Sp2/0 selon la technique classique décrite par Fazekas de St. Groth et Scheidegger (Production of Monoclonal antibodies : strategy and tactics. J. of immunological methods, 35 (1980) 1-21). Les cellules fusionnées provenant d'une rate sont réparties en 10 microplaques à 96 puits et mises en culture en milieu Iscove-HAT enrichi par 10% de sérum foetal de veau inactive loc. cit. Quatorze jours plus tard, la présence d'anticorps dans les cultures est contrôlée par ELISA. Après développement suffisant, les colonies positives sont transférées en plaques à 24 puits et clonées en agar mou. Les résultats indiquent qu'une des anticorps monoclonaux anti P64 (IV C7) permet de distinguer entre les souches de mycobactéries bovines et humaines d'une part, et les souches aviaires et atypiques d'autre part.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de production et de purification d'antigènes protéiques de Mycobacterium Bovis-BCG dans un milieu Sauton carencé en zinc caractérisé par l'addition, lors de la préparation de ce milieu, d'une quantité de zinc égale à environ 10% de la quantité usuellement additionnée (soit environ 0,1425 mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) par litre de milieu, récolte du filtrat et purification des antigènes protéiques.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on utilise la souche 1173 P2 de Mycobacterium tuberculosis var. Bovis-BCG.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la purification est réalisée par des chromatographies successives sur Phenylsepharose, DEAE Sephacel et filtration moléculaire sur Sephadex.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que dans une première étape, le milieu de culture est soumis successivement aux opérations suivantes : décantation et filtration, addition de  $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$  pour atteindre une concentration 0,02 M, et du chlorure de sodium, pour atteindre une concentration 0,45 M addition de Tween 80 et ADTA pour obtenir respectivement une concentration de 0,005% P/V et  $10^{-3}$  M finales, le pH est ajusté à 7,3, ensuite on stérilise et ajoute du phosphate et applique sur une colonne de Phenylsepharose 5 x 16 cm équilibrée par 600 ml de tampon phosphate 0,02 M contenant du chlorure de sodium 0,45 M et de l'EDTA  $10^{-3}$  M.
5. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que dans une deuxième étape, on réalise le lavage et l'élution de la colonne de Phenylsepharose en lavant d'abord le gel par le même tampon que dans la première étape et ensuite successivement par 800 ml des tampons phosphates 0,02 M et 0,004 M et finalement avec le même volume d'éthanol 10% V/V.
6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé



en ce qu'on recueille lors de l'élution avec le tampon phosphate 0,004 M une protéine (P<sub>64</sub>) de poids moléculaire de 64.000 Daltons et lors de l'élution avec l'éthanol 10% V/V, une protéine (P<sub>32</sub>) de poids moléculaire 32.000 Daltons après quoi chaque éluat subit une filtration.

7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que dans une troisième étape à la fraction P<sub>32</sub>, on ajoute un tampon phosphate jusqu'à une concentration de 0,004 M et à l'EDTA jusqu'à une concentration de 10<sup>-4</sup> M, on applique sur des colonnes DEAE Sephacel équilibrée par 500 ml du même tampon phosphate 0,004 M - EDTA 10<sup>-4</sup> M et on élue par 600 ml de tampon phosphate 0,025 M, recueille toutes les fractions du seul pic obtenu et concentre.

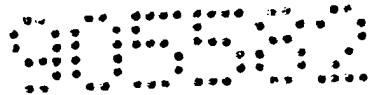
8. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que dans une troisième étape à la fraction P<sub>32</sub>, on ajoute un tampon phosphate jusqu'à une concentration de 0,02 M et à l'EDTA jusqu'à une concentration de 10<sup>-4</sup> M, on applique sur des colonnes DEAE Sephacel équilibrée par 500 ml du même tampon phosphate 0,02 M - EDTA 10<sup>-4</sup> M et on élue par 2 litres un gradient phosphate s'étalant de 0,02 M à 0,12 M, les fractions du pic obtenu sont analysées en électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS) et les fractions purifiées sont rassemblées et concentrées.

9. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que dans une quatrième étape les échantillons sont soumis à une filtration moléculaire sur Sephadex G100.

10. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que dans une quatrième étape les échantillons sont soumis à une filtration moléculaire sur Sephadex G200.

11. Antigènes protéiques caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et 9.

12. Antigènes protéiques caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et 8 et 10.



13. Application des antigènes protéiques selon la revendication 11 ou 12 dans des tests de diagnostic rapide de la tuberculose.

05 14. Application des antigènes protéiques selon la revendication 13 avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, sous forme de trousse de détection de la tuberculose.

10 15. Application des peptides issus par hydrolyse des protéines P<sub>64</sub> et P<sub>32</sub> et des anticorps monoclonaux dirigés contre ces peptides au diagnostic de la tuberculose.

16. Application des peptides issus par hydrolyse de la protéine P<sub>64</sub> comme standard de référence.

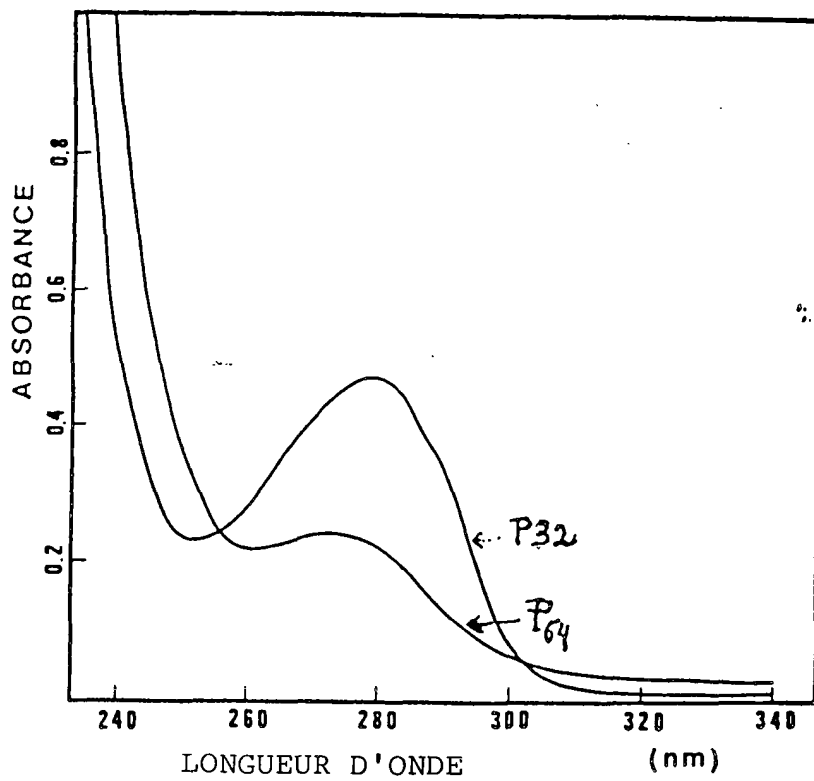
17. Anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre les antigènes protéique des revendications 11 ou 12.

Bruxelles, le 9. 10. 88  
Pour de

PROVINCE DE BRABANT  
Institut PASTEUR  
FREYLINGER & ASSOCIES

Michel VAN MALDEREN

00000



Bruxelles, le 9. 10. 86  
Ppon de

PROVINCE DE BRABANT  
Institut PASTEUR

**FREYLINGER & ASSOCIES**

Michel VAN MALDEREN