

A2

**DEMANDE
DE CERTIFICAT D'ADDITION**

②

N° 81 13524

Se référant : au brevet d'invention n° 80 06537 du 24 mars 1980.

⑤④ Préparations lymphocytaires applicables en thérapeutique humaine, procédé d'obtention et applications.

⑤① Classification internationale (Int. Cl. 3). A 61 K 39/385, 39/395; G 01 N 33/54.

②② Date de dépôt..... 9 juillet 1981.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : Suisse, 15 juillet 1980, n° 5429/80.

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 4 du 29-1-1982.

⑦① Déposant : INSTITUT PASTEUR, établissement déclaré d'utilité publique, résidant en France.

⑦② Invention de : Edgard Hans Relyveld.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Cabinet Harlé et Léchopiez, 21, rue de la Rochefoucauld, 75009 Paris.

Certificat(s) d'addition antérieur(s) :

La présente invention concerne des développements apportés à l'objet du brevet principal, relatif à des préparations cellulaires ayant des propriétés pharmacologiques, un procédé pour leur obtention et leurs applications. L'invention
5 concerne notamment des préparations lymphocytaires à pouvoir immunogène élevé.

Les préparations lymphocytaires selon l'invention sont constituées de lymphocytes normaux d'origine humaine ou animale sur lesquels sont fixées, à leur surface, des substances
10 ayant une activité pharmacologique, et notamment des substances capables d'engendrer la formation ou la fixation d'anticorps.

Les préparations lymphocytaires selon l'invention sont obtenues par couplage des lymphocytes normaux avec la substance ayant une activité pharmacologique, par l'intermédiaire
15 d'un agent de pontage approprié.

L'agent de pontage mis en oeuvre pour la fabrication des préparations lymphocytaires selon l'invention est un agent bifonctionnel qui permet le couplage des lymphocytes
20 avec la substance considérée. On peut utiliser tous les agents de couplage couramment utilisés dans le domaine biochimique et immunologique pour le couplage de protéines entre elles. A titre d'agents de pontage appropriés aux fins de l'invention, on peut citer notamment le glutaraldéhyde, la
25 benzoquinone et similaires.

Dans le domaine immunologique, le glutaraldéhyde est un réactif couramment utilisé, notamment comme agent de couplage de protéines [AVRAMEAS Bull. Soc. Chim. Biol. 1968, 50
n°5-6] ou comme agent de polymérisation pour la fabrication
30 d'immunoadsorbants [AVRAMEAS et TERNYNCK, Immunochemistry, vol.9, pages 53-66(1969)] 7.

La fixation de la substance ayant une activité pharmacologique sur les lymphocytes normaux est réalisée par mise
35 en contact des dites cellules avec la substance en présence d'un tel agent de pontage en quantité suffisante et pendant un temps suffisant pour coupler les lymphocytes et ladite substance.

Dans la pratique, on préfère utiliser comme lymphocytes normaux, les lymphocytes normaux de sang circulant.

Les substances à activité pharmacologique qui entrent dans la composition des préparations lymphocytaires selon l'invention sont toutes substances qui ont des actions physiologiques sur un être vivant. Selon l'invention, on préfère utiliser les substances capables d'engendrer la formation d'anticorps ou de fixer des anticorps.

Parmi les substances à activité pharmacologique, on peut citer notamment les hormones, les haptènes, les substances toxiques, les substances toxiques détoxifiées ou inactivées, les constituants sériques.

Selon une variante de l'invention, pour l'obtention de préparations lymphocytaires dans lesquelles la substance à activité pharmacologique est une substance toxique détoxifiée ou inactivée, on peut d'abord fixer sur les lymphocytes des substances toxiques, qui, par détoxification ou inactivation ultérieure, fournissent sur les lymphocytes des substances à activité pharmacologique.

Au sens de la présente description, on entend par "substance toxique" toute substance contenant des produits antigéniques ou portant des groupements antigéniques, de nature protéique ou non, (par exemple haptène), susceptibles de provoquer la formation d'anticorps spécifiques chez l'homme et l'animal, et en particulier les toxines, les bactéries, les fractions bactériennes, les substances libérées par les bactéries, les virus entiers et leurs fractions, les parasites, leurs fractions, les venins, et autres substances similaires, par exemple les cellules tumorales et leurs fractions.

A titre d'exemples de telles substances toxiques, on peut citer notamment les toxines tétaniques et diphtériques.

On va maintenant décrire plus en détail cette variante de l'invention sans pour autant limiter la portée de l'invention à cette seule variante.

On a en effet trouvé que les préparations lymphocytaires obtenues en partant de substances toxiques et en effectuant une détoxification ou inactivation ultérieure, possèdent un pouvoir immunogène élevé.

On rappellera brièvement ci-après l'état de la technique relatif aux vaccins.

Les micro-organismes qui servent d'antigènes pour la préparation de vaccins sont généralement inactivés par la chaleur, le formol, le phénol ou une combinaison de ces moyens. Ces procédés connus dénaturent parfois les antigènes protecteurs. Il en résulte donc, dans certains cas, une perte de spécificité de la réponse immunologique du sujet vacciné.

Pour inactiver les virus en vue de la préparation de vaccins, on utilise généralement le formol, la β -propiolactone, les rayons U.V. ou l'action combinée d'agents chimiques et physiques.

Un autre moyen pour préparer des vaccins consiste à traiter le produit toxique avec du glutaraldéhyde à une concentration et pendant une durée juste suffisantes pour détoxifier ou inactiver ledit produit toxique, et à arrêter la réaction, dès que ce stade de détoxication ou d'inactivation est atteint, par des moyens physiques et/ou chimiques. Le produit détoxifié ou inactivé ainsi obtenu est utilisable comme vaccin. Un tel procédé est décrit dans le brevet FR 73 16 131 (publié sous le N°2.227.861) et le premier certificat d'addition y attaché n°74 16 936 (publié sous le n°2.270.891).

Par ailleurs, on sait que les vaccins sont utilisés soit sous la forme fluide, soit sous la forme adsorbée sur des supports habituels, tels que l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate de calcium et produits similaires. La stimulation antigénique des vaccins sous la forme adsorbée est en général renforcée par rapport à celle des mêmes vaccins sous la forme fluide.

On a maintenant trouvé que l'on pouvait augmenter le pouvoir immunogène d'antigènes en utilisant des lymphocytes normaux comme supports pour lesdits antigènes, lesdits antigènes étant couplés à la surface desdits lymphocytes à l'aide d'un agent de couplage, tel que le glutaraldéhyde.

Comme on l'a rappelé précédemment, le glutaraldéhyde est utilisé dans le domaine immunologique comme agent de pontage ou de polymérisation.

On a également utilisé le glutaraldéhyde comme agent d'activation de supports solides porteurs de groupes NH_2 , lesdits supports ainsi activés étant utilisés pour la fabrication de produits solides pour la purification d'anticorps, par la mise en contact dudit support activé avec une substance toxique, ladite substance toxique fixée étant ensuite inactivée par traitement avec du glutaraldéhyde. De tels procédé et produit sont décrits dans le second certificat d'addition FR 79 05 088 rattaché au brevet FR 73 13 131 cité ci-dessus. Les supports solides utilisés pour la fabrication de tels produits sont quelconques et peuvent être par exemple des billes de silice poreuse.

A la connaissance de la demanderesse, on n'a jamais utilisé des lymphocytes normaux comme supports d'antigènes. Cependant, il faut noter que l'on a déjà proposé de traiter des cellules avec du glutaraldéhyde. A cet effet, on peut citer les travaux de T. KATAOKA et al. relatés dans les articles ci-après:

-Transplantability of L 1210 Cell in BALB/ c x DBA/2 F1 Mice associated with cell agglutinability by Concanavalin A [Cancer Research 35, 531-534, March 1975].

-Induction of Resistance to L1210 Leukemia in BALB/c x DBA/2 Cr F1 Mice, with L 1210 cells treated with glutaraldehyde and Concanavalin A [Cancer Research 37, 964-968, April 1977].

-Enhanced induction of immune resistance by Concanavalin A-bound L 1210 Vaccine and an immunopotentiator prepared from *Coriolus Versicolor* [Cancer Research 37, 4416-4419, December 1977].

-Blastogenic potency of Concanavalin-A-bound L 1210 leukemic vaccine associated with its immunogenic activity [Gann, 70 , 155-164-April 1979].

-Potentiation of L 1210 murine leukemia vaccine in vivo by levamisole [Gann, 70 , 515-519, Août 1979].

Dans ces documents, il est indiqué que l'antigène tumoral spécifique des cellules L 1210 est présent à la surface des cellules. En ce qui concerne le glutaraldéhyde, il est noté que le traitement des cellules avec une quantité

spécifique de 0,125% de glutaraldéhyde ne semble pas altérer l'immunogénicité des cellules tumorales. Par contre, l'utilisation de quantités de glutaraldéhyde plus importantes semble modifier la surface de cellules puisque les cellules ainsi
5 traitées ne sont plus capables de former une lyse immune avec un sérum anti-cellule L 1210 et du complément. En outre, il est noté que la concentration en glutaraldéhyde est importante pour supprimer la malignité des cellules leucémiques, donc pour les rendre non malignes, et que le glutaraldéhyde
10 aide la concavaline à rester fixée à la surface des cellules, l'activité immunogénique associée aux antigènes de transplantation des cellules étant préservée en présence de la concavaline A. Ces travaux sont donc relatifs à des cellules leucémiques et à l'étude de vaccins leucémiques
15 obtenus à partir de telles cellules traitées avec du glutaraldéhyde et sur lesquelles est liée de la concavaline A. Les structures antigéniques de ces vaccins sont constituées par les cellules elles-mêmes ou des motifs antigéniques portés à leur surface.

20 Ce mode de réalisation de l'invention consiste à mettre en oeuvre des lymphocytes normaux comme supports d'antigènes, qui sont différents des antigènes spécifiques des lymphocytes utilisés.

Dans cette forme de réalisation, le procédé selon la
25 présente invention consiste à mettre en contact des lymphocytes normaux et une substance toxique en présence d'un agent de pontage tel que le glutaraldéhyde en quantité suffisante pour coupler la substance toxique sur les cellules et à détoxifier ou inactiver ladite substance toxique tout en conser-
30 vant les structures antigéniques de ladite substance.

Selon cette variante de l'invention, on utilise une substance toxique quelconque, telle que définie précédemment, qui est susceptible d'être détoxifiée ou inactivée par le glutaraldéhyde dans des conditions contrôlées de manière à
35 ce que le produit résultant reste antigénique et conserve son pouvoir immunisant.

Comme indiqué précédemment, l'agent de pontage, qui peut être du glutaraldéhyde, de la benzoquinone ou produits

similaires, doit être présent en une quantité suffisante pour coupler la substance toxique sur les lymphocytes. On utilise de préférence le glutaraldéhyde. Dans ce cas particulier, la quantité de glutaraldéhyde mise en oeuvre
5 doit être suffisante pour, d'une part, coupler la substance toxique sur les lymphocytes, et, d'autre part, assurer la détoxification ou l'inactivation de la substance toxique. Ainsi, au cours du procédé de l'invention, on met à profit deux types de propriétés du glutaraldéhyde, ses propriétés de pontage
10 d'une part et ses propriétés de détoxification ou d'inactivation d'autre part.

Selon un mode de mise en oeuvre du procédé de l'invention, la mise en contact des lymphocytes et de la substance toxique en présence de glutaraldéhyde est réalisée en ajoutant
15 du glutaraldéhyde à un mélange constitué des cellules et de la substance toxique, ledit mélange et l'addition de glutaraldéhyde étant avantageusement réalisés à la température ambiante. Le mélange réactionnel résultant est maintenu pendant environ 2 à 60 minutes, toujours à la même température, par
20 exemple pendant 15 minutes, puis lavé avec une solution tampon, par exemple une solution tampon phosphate.

Comme indiqué précédemment, la quantité de glutaraldéhyde mise en oeuvre doit permettre le couplage de la substance toxique et en même temps sa détoxification ou inactivation.
25 L'homme de l'art dispose de moyens objectifs de contrôle dans un système donné pour connaître la concentration en glutaraldéhyde, le degré de couplage et la durée du traitement pour réaliser la détoxification ou l'inactivation. A titre d'indication, qui ne doit en aucune façon être considérée
30 comme limitative, on précisera que, dans le cas où la substance toxique est la toxine tétanique, la quantité de glutaraldéhyde à mettre en oeuvre selon la variante ci-dessus correspond à environ 10 fois la quantité nécessaire à l'obtention de l'anatoxine tétanique, selon les enseignements du brevet
35 FR 73 16 131.

La durée du contact correspond approximativement à la durée nécessaire pour la détoxification ou l'inactivation. Selon les enseignements du brevet FR 73 16 131, la réaction

est stoppée par les moyens physiques et/ou chimiques définis ci-après, tels que centrifugation des cellules ou méthodes similaires.

Selon une autre variante de mise en oeuvre du procédé de l'invention, on opère en plusieurs étapes successives:

1) on met en contact les lymphocytes normaux avec du glutaraldéhyde pour activer les lymphocytes,

2) on met les lymphocytes ainsi activés en contact avec la substance toxique;

3) on détoxifie ou inactive la substance toxique fixée sur les lymphocytes par traitement avec du glutaraldéhyde dans des conditions contrôlées, c'est-à-dire avec une concentration de glutaraldéhyde et pendant une durée juste suffisante pour détoxifier ou inactiver la substance toxique, la réaction étant arrêtée par centrifugation ou méthodes similaires dès que ce stade de détoxification ou d'inactivation est atteint. On notera que l'étape 3) ci-dessus est une étape connue, décrite en détail dans le brevet FR 73 16 131, auquel on pourra se référer en cas de besoin.

Les conditions de mise en oeuvre de la première étape définie ci-dessus ne sont pas critiques. Il suffit d'utiliser des conditions propres à assurer la fixation du glutaraldéhyde sur les lymphocytes normaux et, à cet effet, on préfère mettre en oeuvre un certain excès de glutaraldéhyde lors du contact avec les lymphocytes, après quoi on lave ceux-ci pour éliminer le glutaraldéhyde libre non fixé, le lavage étant avantageusement réalisé avec une solution tampon, telle qu'une solution tampon phosphate classique. Cette étape est avantageusement réalisée à la température ambiante.

A l'issue de la première étape, on obtient des lymphocytes normaux activés au glutaraldéhyde. On réalise alors la réaction avec la substance toxique après avoir lavé le mélange réactionnel résultant de la première étape pour éliminer le glutaraldéhyde en excès selon des moyens classiques appropriés, par exemple avec une solution tampon phosphate. Les conditions particulières de la réaction peuvent naturellement varier quelque peu selon la nature de la substance toxique. En général, on utilise la substance toxique sous la

forme d'une solution, en quantité suffisante pour saturer les lymphocytes, ce qui implique l'utilisation d'un léger excès de substance toxique, allant dans la pratique jusqu'à 100 à 1000 fois.

5 On laisse en contact la substance toxique avec les lymphocytes activés pendant le temps nécessaire à la fixation, de préférence en opérant à une température appropriée, qui ne dénature pas l'intégrité de la substance toxique, par exemple à la température ordinaire. On lave ensuite le produit ré-
10 sultant pour éliminer la substance toxique en excès par tout moyen classique approprié, par exemple avec une solution tampon.

On procède ensuite à la détoxification ou inactivation de la substance toxique fixée sur les lymphocytes normaux
15 par traitement avec du glutaraldéhyde dans des conditions contrôlées. Dans ce cas, le glutaraldéhyde n'est pas utilisé comme réactif de pontage ou de réticulation mais comme agent d'inactivation ou de détoxification selon les enseignements du brevet ^{FR} 73 16 131.

20 On rappellera que la détoxification ou inactivation à l'aide de glutaraldéhyde selon le brevet FR 73 16 131 doit être faite dans des conditions contrôlées, de manière à obtenir notamment une souche virale qui a perdu ses propriétés de multiplication mais a conservé ses structures antigéniques
25 vaccinales. Il importe donc de stopper la réaction entre le glutaraldéhyde et le milieu réactionnel résultant de la seconde étape à un moment contrôlé de façon à enlever la toxicité du produit initial mais sans le dénaturer.

30 Parmi les moyens qui peuvent être utilisés pour arrêter cette réaction, on indiquera, à titre d'exemple, les moyens ci-après:

- par voie chimique, consistant à éliminer le glutaraldéhyde en excès en ajoutant au milieu réactionnel un agent chimique capable de réagir avec le glutaraldéhyde, tel que par
35 exemple les amino-acides, par exemple la lysine ou la glycine, ou des sels inorganiques, tels que le bisulfite de sodium,

- par voie physique, par exemple par dialyse du milieu réactionnel contre une solution tampon ou encore par cen-

trifugation.

Le produit obtenu selon le procédé de l'invention, qui constitue un autre objet de l'invention, peut être défini comme étant une préparation lymphocytaire dans laquelle
5 les cellules présentent, fixés à leur surface, des groupements antigènes.

Les préparations lymphocytaires selon l'invention peuvent être aisément identifiées par examen au microscope ou par des méthodes classiques de réactions immunologiques, qui
10 permettent de révéler la présence d'antigènes, ou encore par des méthodes biochimiques.

On peut également mettre en évidence la possibilité de ces préparations lymphocytaires de produire des anticorps grâce à des antigènes qui n'ont rien à voir avec les
15 antigènes des lymphocytes.

Les préparations lymphocytaires ou antigènes selon l'invention présentent, de manière surprenante, un pouvoir immunogène élevé et supérieur à celui des anatoxines, sous
forme fluide ou même sous forme adsorbée.

Ces préparations lymphocytaires peuvent être utilisées par exemple à titre de vaccins pour le traitement préventif, chez l'homme et l'animal, d'affections causées par les toxines
20 microbiennes ou venimeuses, les germes, bactéries, virus et microorganismes les plus variés.

Sous un autre aspect, l'invention concerne également les sérums hyperimmuns obtenus par prélèvement chez l'homme ou sur un animal, tel que le cheval par exemple, auquel on a administré une préparation lymphocytaire selon l'invention à périodes rapprochées selon les techniques classiques
25 d'immunisation. Ces sérums peuvent, de façon connue, être utilisés pour le traitement préventif et curatif chez l'homme et l'animal des affections causées par des microorganismes ou leurs dérivés correspondant au vaccin administré. Ces sérums sont également applicables comme produits de diagnos-
30 tic et pour l'analyse immunologique.

L'invention va être maintenant décrite en détail par l'exemple illustratif ci-après, dans lequel on a utilisé, comme support, des lymphocytes normaux de sang circulant.

EXEMPLE 1-

Les lymphocytes du sang périphérique ont été prélevés sur héparine (anticoagulant) et séparés de manière connue sur Ficoll-diatrizoate. A titre de substance ayant une activité pharmacologique, on a utilisé la toxine tétanique. La fixation de l'anatoxine sur les lymphocytes a été réalisée de la même manière qu'à l'exemple 2 (préparation B) du brevet FR/80 06 537. Comme décrit précédemment, la quantité de toxine fixée a été calculée à l'aide de la toxine marquée à l'iode ¹²⁵I.

10 Les préparations cellulaires selon l'invention (lymphocytes + anatoxine) ont été diluées à 10 UF/ml et ont été utilisées pour la vaccination de lapins (fauve de Bourgogne) à raison de 0,5 ml de préparation par voie sous-cutanée. La quantité injectée d'anatoxine était donc égale à 5 UF d'anatoxine.

Dans deux essais conformes à l'invention, on a mis en oeuvre, respectivement, des lymphocytes de lapin (fauve de Bourgogne) et des lymphocytes de souris (Swiss). On a comparé les résultats de vaccination obtenus avec deux produits classiques (vaccination effectuée selon le mode opératoire de l'exemple 2 du brevet FR 80 06 537).

-le produit IPAD-T (anatoxine tétanique adsorbée sur phosphate de calcium,

-une anatoxine fluide (obtenue par action du formol sur la toxine tétanique).

25 Les deux produits connus ont été également injectés aux lapins à la dose de 5 UF d'anatoxine.

Le pouvoir protecteur des différents vaccins tétaniques a été apprécié en mesurant le titre en anticorps circulants [^{U.A.I./ml}] chez le lapin.

30 Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 1.

Les résultats du tableau 1 montrent que les préparations cellulaires de l'invention, obtenues à partir de cellules normales (lymphocytes) procurent des titres d'anticorps circulants dès la quatrième semaine après l'injection tandis qu'il faut attendre 10 à 12 semaines pour les deux autres préparations classiques. En outre, les titres à 12 semaines sont plus élevés avec les produits de l'invention.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour l'obtention de préparations lymphocytaires à pouvoir immunogène élevé, consistant à mettre en contact des lymphocytes avec une substance à activité pharmacologique capable d'engendrer la formation d'anticorps ou de
5 fixer des anticorps, en présence d'un agent de pontage en quantité suffisante et pendant un temps suffisant pour coupler de manière purement chimique les lymphocytes avec ladite substance, caractérisé en ce que les lymphocytes sont des lymphocytes normaux.

10 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les lymphocytes normaux sont des lymphocytes normaux d'origine humaine ou animale par exemple des lymphocytes normaux de sang circulant.

15 3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la substance à activité pharmacologique capable d'engendrer la formation d'anticorps ou de fixer des anticorps est une substance toxique.

20 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la substance toxique est choisie parmi les toxines, les bactéries, les fractions bactériennes, les substances libérées par les bactéries, les virus entiers et leurs fractions, les parasites, leurs fractions, les venins, et autres substances similaires, par exemple des cellules tumorales et leurs fractions.

25 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'agent de pontage est le glutaraldéhyde ou la benzoquinone.

30 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact les lymphocytes normaux et une substance toxique en présence de glutaraldéhyde en quantité suffisante pour coupler la substance toxique sur les lymphocytes normaux et à détoxifier ou inactiver ladite substance toxique tout en conservant les structures antigéniques de ladite substance
35 toxique.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la mise en contact des lymphocytes normaux et de la substance toxique avec le glutaraldéhyde est réalisée

par addition de glutaraldéhyde à un mélange constitué des lymphocytes et de ladite substance toxique.

5 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'on opère convenablement en ne dénaturant pas l'intégrité de la substance toxique, notamment à la température ordinaire.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 6, caractérisé en ce qu'il consiste:

(1) à mettre en contact les lymphocytes normaux avec du glutaraldéhyde pour activer les lymphocytes,

10 (2) à mettre les lymphocytes normaux ainsi activés en contact avec la substance toxique;

(3) à détoxifier ou inactiver la substance toxique fixée sur les lymphocytes par traitement avec du glutaraldéhyde avec une concentration de glutaraldéhyde et pendant une durée juste suffisantes pour détoxifier ou inactiver la substance toxique tout en conservant ses structures antigéniques, ledit traitement avec le glutaraldéhyde étant arrêté par des moyens physiques et/ou chimiques dès que ce stade de détoxification ou d'inactivation est atteint.

20 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que dans l'étape (1), on opère en présence d'un excès de glutaraldéhyde et que le mélange réactionnel est lavé avant l'étape (2) de manière à éliminer le glutaraldéhyde en excès, et en ce que, dans l'étape (2), on opère avec un excès de substance toxique, et qu'après fixation de ladite substance, on lave le milieu réactionnel pour éliminer la substance toxique en excès.

30 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la substance toxique est la toxine tétanique ou la toxine diphtérique.

12. Préparations lymphocytaires à pouvoir immunogène élevé obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisées en ce que les lymphocytes normaux présentent, fixés à leur surface, des groupes antigènes.

35 13. Vaccins, caractérisés en ce qu'ils contiennent, à titre de substance antigénique, une préparation lymphocytaire selon la revendication 12.

14.Sérums hyperimmuns obtenus par prélèvement sur l'homme ou sur un animal, tel que le cheval, auquel on a administré un vaccin selon la revendication 13.

5 15.Application des vaccins selon la revendication 13 pour le traitement préventif chez l'homme et l'animal, d'affections causées par les toxines microbiennes ou venimeuses, les germes, bactéries, virus et autres microorganismes.

10 16.Application des sérums selon la revendication 14 au traitement préventif et curatif chez l'homme et l'animal des affections causées par des microorganismes ou leurs dérivés correspondant audit vaccin.

17.Application des sérums selon la revendication 14 au diagnostic et à l'analyse immunologique.