



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

N° 896.253

Classif. Internat. :

Mis en lecture le :

C12N/C129

18-07-1983

Le Ministre des Affaires Economiques,

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

Vu le procès-verbal dressé le 24 mars 1983 à 14 h. 10
au Service de la Propriété industrielle;

ARRÊTE :

Article 1. — *Il est délivré à :* REGION WALLONNE, représentée par
l'EXECUTIF REGIONAL WALLON
Boulevard de l'Empereur 11, 1000 Bruxelles,

repr. par Mr. A. Blanchart, c/o CGCT, Propriété
Industrielle, Place Joséphine Charlotte 3, (27-28)
5100 Jambes

un brevet d'invention pour : Anticorps monoclonaux dirigés contre
l'urokinase humaine

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 15 avril 1983

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE :

Le Directeur Général

R. RAUX

Anticorps monoclonaux dirigés contre l'urokinase humaine

La présente invention concerne des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine humaine urokinase.

5 L'urokinase est une protéine synthétisée dans le rein et excrétée dans l'urine. Cette protéine fonctionne en tant qu'activateur du plasminogène. A cet égard, l'urokinase possède une valeur thérapeutique bien établie puisqu'elle conduit à la dissolution des
10 caillots sanguins in vivo. Deux formes de l'enzyme sont actuellement produites commercialement, la forme lourde, 54.000 daltons, et son dérivé plus court, 33.000 daltons. Les deux espèces protéiques sont utilisées en thérapeutique humaine pour combattre les
15 maladies thromboemboliques. Un certain nombre de tumeurs, tels les carcinomes de l'ovaire, produisent de l'urokinase en relativement grande quantité. A cet égard, la disponibilité d'un système de dosage de l'urokinase dans les fluides biologiques pourrait
20 faciliter la détection précoce de tumeurs.

Les procédés de purification de l'urokinase au départ de sources conventionnelles, telle l'urine, ou de milieu de culture de cellules humaines embryonnaires rénales, reposent sur des procédés de fractionnement
25 classiques. Un système de purification simple et économique serait de nature à diminuer le coût de production de l'urokinase et à élargir son usage thérapeutique.

Dans le cadre de l'invention, on a maintenant
30 trouvé que pour doser l'urokinase dans des fluides biologiques et pour purifier l'enzyme, on peut avoir recours à un ensemble d'anticorps monoclonaux qui sont dirigés contre l'urokinase humaine.

L'invention a pour objet un ensemble de 18
35 anticorps monoclonaux dirigés contre l'urokinase

humaine. Par "ensemble" on comprend la totalité des 18 anticorps.

Suivant la présente invention, l'ensemble d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'urokinase humaine comporte 18 anticorps monoclonaux dont 14 sont d'isotype IgG1 et 4 sont d'isotype IgG2. Tous les anticorps de l'ensemble ont une chaîne légère de type K et diffèrent par leur isotype. Un autre caractère de l'ensemble d'anticorps monoclonaux selon l'invention, tient à ce qu'un anticorps inhibe l'activité enzymatique de l'urokinase humaine. Tous les anticorps monoclonaux de cet ensemble reconnaissent différents épitopes de l'urokinase humaine.

On a montré de plus que divers anticorps monoclonaux de cet ensemble ne sont pas mutuellement inhibants, c'est-à-dire se lient ensemble à l'urokinase humaine, tandis que d'autres sont mutuellement inhibants, c'est-à-dire qu'ils ne se lient pas simultanément à l'urokinase humaine.

Suivant la présente invention, l'ensemble d'anticorps monoclonaux tel que revendiqué trouve une application nouvelle pour la détection de l'urokinase humaine dans les fluides biologiques.

Par fluides biologiques, on comprend notamment l'urine, les liquides tumoraux, par exemple les ascites et les milieux de culture cellulaire.

Pour la détection de l'urokinase humaine dans des fluides biologiques, un des anticorps monoclonaux est fixé sur une matrice solide, mis en contact avec un liquide biologique contenant l'urokinase humaine, ensuite avec un deuxième anticorps dudit ensemble marqué de manière connue, par exemple par radio activité ou par une enzyme. La matrice est d'une nature quelconque et peut être par exemple choisie parmi les matrices polymères solides telles que le chlorure de polyvinyle.

u

Le marquage du 2ème anticorps peut être obtenu de préférence, par un marquage enzymatique et plus particulièrement à la peroxydase qui peut ensuite réagir avec un substrat chromogénique et être ainsi
5 décelé.

La réalisation du test sandwich en phase solide pour le dosage de l'urokinase humaine peut s'effectuer selon des procédés classiques mais on peut simplifier substantiellement le procédé en faisant incub
10 ensemble des anticorps non marqués et marqués dès le début de l'essai.

Le procédé de détection de l'urokinase humaine basé sur l'application de deux anticorps monoclonaux de l'ensemble pour un test sandwich en phase solide permet
15 de détecter jusqu'à une concentration de 1 ng/ml dans des fluides biologiques.

Une autre application nouvelle de cet ensemble d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'urokinase humaine consiste dans leur utilisation pour la
20 purification de l'urokinase humaine.

La plupart des méthodes de purification de l'urokinase reposent sur la concentration de grands volumes d'urine ou de milieu de culture, sur une série de procédés chromatographiques classiques et/ou sur
25 l'emploi de colonnes d'affinité portant des analogues des substrats naturels de l'urokinase.

L'utilisation de un ou plusieurs anticorps monoclonaux antiurokinase de l'ensemble revendiqué fournit un moyen simple et efficace de purifier
30 l'urokinase. Dans le cadre de l'invention on a développé une méthode chromatographique basée sur l'emploi d'un ou de plusieurs anticorps monoclonaux faisant partie de l'ensemble tel que revendiqué.

La matrice solide utilisée est d'un type habituellement utilisé en chromatographie d'affinité.
35 On utilise de préférence comme support solide

l'Affi-gel 10 de Biorad Laboratories.

Pour une purification à l'échelle commerciale, l'affinité de l'anticorps monoclonal utilisé doit être suffisamment élevée pour que l'urokinase soit retenue de façon quantitative sur la colonne.

L'urokinase purifiée suivant la présente invention peut être utilisée dans des buts cliniques.

La préparation des anticorps monoclonaux s'effectue selon une technologie de fusion cellulaire classique, dérivée de celle publiée par Köhler, G et Milstein, C., 1976, Eur.J.Immunol.6, 511, dans laquelle on fusionne des cellules de myélome avec des cellules de rate de souris qui ont été immunisées avec l'urokinase humaine. Les hybridomes ainsi obtenus sécrètent des anticorps monoclonaux contre l'urokinase humaine. Selon un aspect particulier de l'invention, les anticorps monoclonaux sont sécrétés par différents hybridomes.

Nous donnons ci-après une description, à titre d'exemple non limitatif, d'une méthode de préparation de l'ensemble des 18 anticorps monoclonaux contre l'urokinase humaine faisant l'objet de la présente invention.

Préparation des anticorps monoclonaux

1. Immunisation de souris

L'urokinase humaine (forme 33.000 daltons) est disponible en quantité suffisante et à l'état hautement purifié, et peut être utilisée comme antigène. Cette préparation a été utilisée pour immuniser des souris femelles (souche A/J) âgées de 8 semaines. On immunise tout d'abord les souris avec 100 μ g d'antigène émulsifié dans l'adjuvant complet de Freund et on injecte le mélange par voie sous-cutanée et intra-péritonéale. Trois semaines plus tard, les souris reçoivent une injection de rappel, 100 μ g d'antigène dans l'adjuvant incomplet de Freund, par voie intra-péritonéale. Après une période de repos de 6

4

semaines, les souris reçoivent au jour -3 et -4 avant la fusion, respectivement 200 μ g d'antigène (en NaCl 0.15 M) par voie intra-péritonéale et 400 μ g d'antigène (en NaCl 0.15 M) par voie intra-péritonéale et intraveineuse. Au jour 0, on sacrifie les souris et prélève la rate pour la préparation des cellules destinées à la fusion cellulaire.

2. Fusion cellulaire

Pour effectuer la fusion cellulaire, on utilise les matières et les milieux suivants. On obtient chez GIBCO, le milieu DMEM que l'on complète avec du sérum de cheval (10 %), du sérum de veau (5 %), des acides aminés non essentiels, du pyruvate de sodium (1mM), de la pénicilline (100 U/ml) et de la streptomycine (100 g/ml).

Le milieu de sélection complet (HAT) se compose du milieu décrit ci-dessus ainsi que d'hypoxanthine (10^{-4} M), d'aminoptérine (4.10^{-7} M) et de thymidine ($1,5.10^{-5}$ M). Le milieu solide contenant de l'agar (1,5%) comporte les ingrédients décrits ci-dessus. Les cellules sont cultivées à 37° C dans une atmosphère humide de 5 % CO₂ et 95 % d'air.

La fusion avec une lignée cellulaire de myélome de souris (clones sélectionnés SP2/O-Ag14) est réalisée selon le procédé de Franssen, J.D., Hérion, P. and Urbain, J., 1981, Proc. XXIX Colloquium on Protides of the Biological Fluids, Peeters Ed. Selon ce protocole, $3,5.10^8$ cellules de rate sont fusionnées avec 3.10^7 cellules de myélome de la lignée SP2/O-Ag14. Après chaque fusion, on distribue les cellules fusionnées dans des plaques de microculture à 96 puits en effectuant des dilutions de 10 en 10 fois. Les cultures sont alimentées au jour 5, 8, 11 et 13 après la fusion en remplaçant la moitié du milieu dans les puits par du milieu frais. Au jour 15 après la fusion, 50 μ l du surnageant de chaque culture est testé dans

4

un radio-immunoessai en phase solide pour détecter la sécrétion d'anticorps contre l'urokinase.

3. Détection des hybridomes spécifiques de l'urokinase humaine par un test radio-immunologique en phase solide (SPRIA)

5 Ce procédé consiste à fixer de l'urokinase (50 μ l d'une solution 10^{-7} M en PBS pH 8) dans chaque puit de plaques PVC microwell LINBRO pendant une nuit à 4°C. Après saturation des sites libres par de la sérum albumine (1% BSA en PBS pH 8, 37°C, 8 h) et quatre lavages avec le PBS pH 8, chaque puit reçoit 40 μ l de surnageant des cultures cellulaires. La réaction a lieu pendant 16 h à 20°C. Après lavage au PBS pH 8, les anticorps fixés à l'urokinase immobilisée sont révélés par des immunoglobulines (Fab) de lapin anti-souris marquées à l'iode 125 (10.000 cpm/ng, 16 h à 20°C). Après lavage, les cupules sont séchées, découpées et comptées dans un compteur à scintillation gamma.

4. Propagation dans les ascites

20 $5 \cdot 10^5$ cellules hybridomes ont été injectées intra-péritonéalement dans des souris (syngéniques ou F1 progeny) qui ont été préalablement traitées au pristane.

5. Purification des anticorps monoclonaux au départ de liquide ascitique

25 Le procédé décrit par Staehelin, T., Mobbs, D.S., Hsiang-Fu, K., Chun-yen, L. and Pestka, S., 1981, J.Biol.Chem. 256, 9750, a été suivi dans son entièreté, si ce n'est que la DEAE a été remplacée par la DEAE Affi-gel Blue (Biorad) pour éliminer les protéases. Toutes les opérations se font à 4°C. Les fractions d'anticorps monoclonaux sont recueillies, précipitées deux fois au sulfate de sodium (18 % final) et dialysées contre un tampon carbonate 0,1 M pH 8,5.

35 6. Clonage et identification

Les cellules de vingt puits positifs dans le test

SPRIA ont été propagées dans le milieu approprié puis clonées en agar mou. 18 lignées cellulaires sur les 20 analysées sécrètent des immunoglobulines. Ces lignées ont été reclonées et retestées dans le système SPRIA. Ce protocole a permis de récupérer 18 hybridomes distincts sécrétant des anticorps monoclonaux antiurokinase. La classe d'Ig à laquelle appartiennent ces anticorps monoclonaux fut déterminée par test d'Ouchterlony sur le surnageant de culture des cellules. 14 anticorps monoclonaux appartiennent à la classe IgG1 et 4 à la classe IgG2. Pour tous les anticorps monoclonaux, les chaînes légères sont de type K. Les hybridomes ont été injectés et se sont propagés dans des ascites. Les liquides ascitiques recueillis ont été analysés par le test SPRIA et par électrophorèse sur acétate de cellulose; ils contiennent en moyenne de 2 à 10 mg/ml d'anticorps monoclonaux anti-urokinase.

Plusieurs surnageants d'hybridome ou d'anticorps purifiés ont été analysés pour leur effet sur l'activité enzymatique de l'urokinase; l'essai met en oeuvre le substrat chromogénique S2444 (Kabi). Les résultats montrent qu'un seul anticorps monoclonal que l'on désigne par AAU18 inhibe l'activité enzymatique de l'urokinase.

La table 1 indique la classe d'immunoglobulines à laquelle appartiennent les anticorps monoclonaux de l'ensemble selon l'invention.

La table 2 donne le titre des liquides ascitiques pour quelques-uns des anticorps monoclonaux de l'ensemble selon l'invention.

La figure 1 montre l'inhibition de l'activité enzymatique de l'urokinase (A 405) par les anticorps monoclonaux AAU 18 (■) et AAU7 (●) en fonction de la concentration en anticorps (4g).

La figure 2 montre la spécificité des anticorps

monoclonaux pour l'urokinase humaine .

TABLE 1

Classes d'immunoglobulines des anticorps monoclonaux

5		: Classe	:	Hybridome	:
		:	:	:	:
		: IgG1K	:	AAU2, AAU3, AAU4, AAU5, AAU6	:
		:	:	AAU7, AAU8, AAU9, AAU11, AAU15	:
		:	:	AAU16, AAU17, AAU18, AAU19	:
10		: IgG2K	:	AAU1, AAU12, AAU13, AAU14	:

TABLE 2

Titres en anticorps des liquides ascitiques, déterminés par radioimmunoassay

15		-----	
	:	Clone	:
	:	:	:
	:	AAU1	:
	:	AAU2	:
20	:	AAU7	:
	:	AAU16	:
	:	AAU17	:
	:	AAU18	:

25 Le titre est donné par le facteur de dilution des liquides ascitiques donnant lieu à 50 % de fixation de l'antigène marqué à l'iode 125.

30 L'inhibition de la fixation de l'urokinase marquée à l'¹²⁵I (en ordonnée) sur les différents anticorps monoclonaux testés, AAU2 et AAU16, est donnée en fonction des concentrations en inhibiteur (en abscisse): urokinase native (●) chymotrypsine (▲), elastase (✱), trypsine (▼) et kallikrein(▲). Les résultats
35 obtenus avec un antisérum conventionnel sont également

6

donnés (■).

Les applications de cet ensemble de 18 anticorps monoclonaux contre l'urokinase humaine seront mieux comprises à l'aide des exemples non limitatifs suivants.

Exemple 1

Dosage de l'urokinase dans des fluides biologiques

Le dosage de l'urokinase dans des fluides biologiques tels l'urine ou des liquides tumoraux requiert un essai sensible et rapide. A cet égard, un immuno-essai basé sur l'emploi d'anticorps monoclonaux se révèle très satisfaisant.

Dans l'ensemble d'anticorps monoclonaux décrits dans l'invention, on a identifié les 2 anticorps monoclonaux les plus favorables à la mise au point du système de dosage. En fait, on choisit des anticorps monoclonaux qui se fixent à des épitopes distincts de l'urokinase et dont la fixation n'est pas mutuellement exclusive. On procède donc à la classification des anticorps monoclonaux selon l'épitope reconnu; ces informations sont reprises dans la table 3.

On choisit les anticorps monoclonaux AAU2 et AAU6 parce que d'une part, AAU2 se fixe très bien sur une matrice en polystyrène et que, d'autre part, AAU6 convient parfaitement au marquage par une enzyme, la peroxydase. On peut alors calibrer l'essai en procédant comme suit. Des plaques de polystyrène (NUNC Immunoplate I) sont recouvertes du premier anticorps monoclonal AAU2 (purifié selon Staehelin, T., Hobbs, D.S., Hsiang Fu Kung, Chun-Yen Cai and Pestka, S., 1981, J.Biol.Chem.256, 9750-9754). Après saturation des sites libres, on incube l'anticorps immobilisé avec une solution témoin d'urokinase (concentration décroissante). On fait réagir ensuite le deuxième anticorps monoclonal AAU6 purifié et marqué à la

6

peroxydase (O'Sullivan, M.J. and Marks, V., 1981, in "Methods in Enzymology" vol. 73, 147, Academic Press, New York).

On révèle ensuite la présence de complexes spécifiques par le substrat chromogénique de la peroxydase (orthophenylenediamine). On enregistre alors l'absorbance à 492 nm dans un lecteur automatique microelisa Dynatech AM120. On peut raccourcir l'essai tout en gardant une bonne sensibilité en incubant simultanément l'urokinase et le deuxième anticorps monoclonal AAU6 marqué à la peroxydase. Lorsqu'on applique ces protocoles, on détecte l'urokinase jusqu'à une concentration de 2ng/ml. L'essai est reproductible et peut être réalisé sur des plaques, préalablement recouvertes du premier anticorps monoclonal AAU2, conservées à 4°C pendant plusieurs jours ou séchées.

Le dosage de l'urokinase a été réalisé sur des échantillons d'urine humaine et sur des liquides tumoraux obtenus dans les hopitaux.

La figure 3 montre la courbe de dosage de l'urokinase utilisant le test selon l'invention. L'absorption à 492 nm (en ordonnée) est donnée en fonction de la concentration en urokinase ng/ml (en abscisse) pour un échantillon standard d'urokinase 54.000 daltons (■) et d'urokinase 33.000 daltons (●) et pour un échantillon d'urine (▲).

La table 4 donne la quantification de l'urokinase dans diverses tumeurs.

Exemple 2

Purification de l'urokinase humaine par chromatographie d'affinité

On a développé une méthode chromatographique basée sur l'emploi d'un anticorps monoclonal faisant partie de l'ensemble selon l'invention. Le choix du meilleur anticorps monoclonal repose sur la nécessité d'obtenir une récupération élevée de l'antigène sans perte

4

d'activité de celui-ci.

TABLE 3

Spécificité d'épitope des anticorps monoclonaux dirigés contre l'urokinase humaine

5	-----			
	: Spécificité :	Anticorps monoclonal	:	
	: d'épitope :		:	
	-----		-----	
	: groupe I :	AAU6, AAU9	:	
10	: groupe II :	AAU1, AAU2, AAU12, AAU17	:	
	: groupe III :	AAU3, AAU5, AAU8	:	
	: groupe IV :	AAU4	:	

AAU12 et AAU17 inhibent faiblement la fixation de
15 AAU2 à l'urokinase humaine.

TABLE 4

Dosage de l'urokinase dans des fluides ascitiques (asc.) et des effusions pleurales (e.p.) .

20	: Origine supposée :	Fluide	:	Urokinase :
	: des tumeurs associées :		:	(ng/ml) :
	-----		-----	
	: ovaire :	asc.	:	< 3.2 :
	: sein :	e.p.	:	< 3.2 :
25	: sein :	e.p.	:	3.8 :
	: uterus :	e.p.	:	< 3.2 :
	: sein :	e.p.	:	< 3.2 :
	: rein :	asc.	:	4.5 :
	: ovaire :	asc.	:	29 :
30	: inconnue :	e.p.	:	8.3 :
	: melanome :	asc.	:	6.4 :
	: inconnue :	e.p.	:	18 :
	: sein :	e.p.	:	21 :
	: ovaire :	asc.	:	< 3.2 :
35	: inconnue :	e.p.	:	< 3.2 :

43

On a donc fixé 5 anticorps monoclonaux purifiés à de l'Affi-gel 10 (Biorad) dans les conditions décrites par le fournisseur, puis on a incubé ces anticorps immobilisés avec une solution d'urokinase. Après lavage, on a décroché l'urokinase et on a mesuré le taux de récupération ainsi que l'activité enzymatique de l'enzyme qui est mesurée à l'aide du substrat S2444, Kabi. On a trouvé que l'anticorps monoclonal AAU2 convient idéalement à la chromatographie d'affinité en ce sens que la récupération de l'urokinase est totale et qu'il n'y a pas de perte d'activité.

Les conditions de l'essai sont les suivantes : incubation de l'urokinase avec l'anticorps immobilisé pendant 3 heures à 4°C en tampon PBS. Lavage de la colonne avec le tampon PBS puis avec un tampon phosphate (0,1 M pH 7,5) contenant 0,15 M NaCl et 0,1 % Tween 80. Elution de l'urokinase par un tampon 0,2 M acétate pH 3 contenant 0,15 M NaCl et 0,1 % Tween 80. Les fractions sortant de la colonne sont immédiatement neutralisées avec du Tris 1 M pH 8, puis testées pour l'activité enzymatique. On peut vérifier par électrophorèse que l'urokinase éluée de la colonne est essentiellement pure et, sur base de l'activité enzymatique, que l'activité spécifique de l'enzyme est d'environ 140.000 IU/mg. On a déterminé que la capacité de la colonne d'affinité est de 2.5 mg d'urokinase par ml de support d'affinité. De plus, la colonne d'affinité portant l'anticorps monoclonal AAU2 peut être reconditionnée et réutilisée plusieurs fois sans perte des propriétés de fixation de l'urokinase.

Etant donné que l'on peut obtenir de l'ordre de 30 mg d'anticorps monoclonal purifié au départ du liquide d'ascite d'une souris, on peut réaliser des colonnes d'affinité de grande dimension et appliquer la méthode à la purification de l'urokinase au départ de grands échantillons d'urine humaine ou de milieu de culture de

6

cellules humaines embryonnaires rénales.

La table 5 montre la purification de l'urokinase par chromatographie d'affinité.

TABLE 5

5

Purification de l'urokinase par chromatographie d'affinité utilisant l'anticorps monoclonal AAU2

	:Fraction	: Vol:	Protéines:	Activité:	%	: Activité :
10	:	:	: totales :	totale :	:	: spécifique :
	:	:(ml):	(O.D.):	(i.U.) :	:	: (i.U/O.D.):
	:-----:-----:-----:-----:-----:-----:					
	:extrait	: 0,5:	2,4	: 51.400	:100,0:	17.700 :
	: brut	:	:	:	:	:
15	:fraction	: 5,0:	1,8	: 1.160	: 2,0:	640 :
	:non retenue:	:	:	:	:	:
	:fraction	: 2,5:	0,43	: 55.100	:107,0:	128.000 :
	:retenue et	:	:	:	:	:
	:éluée	:	:	:	:	:

20

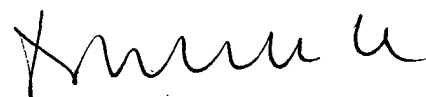
L'activité totale récupérée de la colonne semble légèrement plus élevée que dans l'extrait brut; ceci pourrait être dû au démasquage de sites actifs.

h

REVENDEICATIONS

1. Ensemble d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'urokinase humaine caractérisé en ce que cet ensemble comporte 18 anticorps monoclonaux dont 14 sont d'isotype IgG1 et 4 sont d'isotype IgG2, que ces anticorps ont tous une chaîne légère de type κ , qu'ils reconnaissent différents épitopes et qu'un des anticorps inhibe l'activité enzymatique de l'urokinase humaine.
2. Utilisation de cet ensemble d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'urokinase humaine suivant la revendication 1 pour la détection de l'urokinase humaine dans des fluides biologiques.
3. Utilisation de cet ensemble d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'urokinase humaine suivant la revendication 2, caractérisée en ce qu'un des anticorps de l'ensemble est fixé sur une matrice solide, est mis en contact avec un liquide biologique contenant l'urokinase humaine, ensuite avec un 2ème anticorps dudit ensemble préalablement marqué.
4. Utilisation de cet ensemble d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'urokinase humaine suivant les revendications 2 et 3, caractérisée en ce que le deuxième anticorps dudit ensemble est marqué à la peroxydase, cet enzyme réagissant ensuite avec un substrat chromogénique.
5. Utilisation de cet ensemble d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'urokinase humaine suivant la revendication 1 pour la purification de l'urokinase humaine.
6. Utilisation de cet ensemble d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'urokinase humaine suivant la revendication 5 caractérisée par l'utilisation d'une colonne d'affinité comprenant une matrice solide sur laquelle ont été fixés un ou plusieurs anticorps de l'ensemble.

Bruxelles, le 24 mars 1983.



A. BLANCHART, Par procurati.

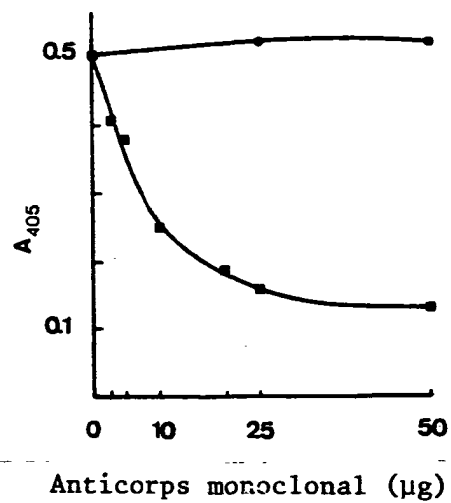


Fig. 1

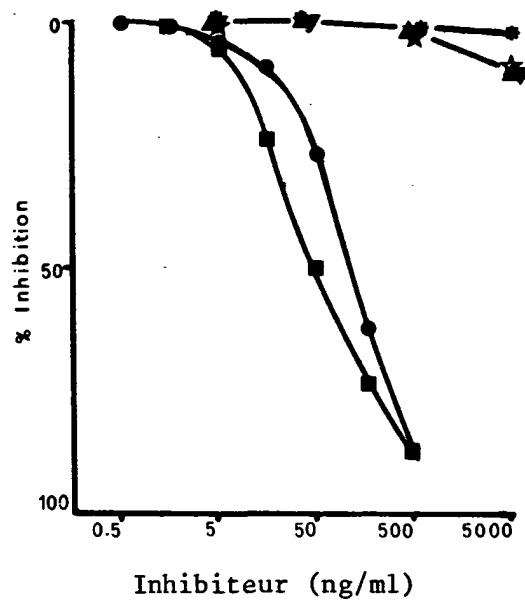


Fig. 2

Bruxelles, le 24 mars 1983.

A. Blanchart
A. BLANCHART, Par procuration.

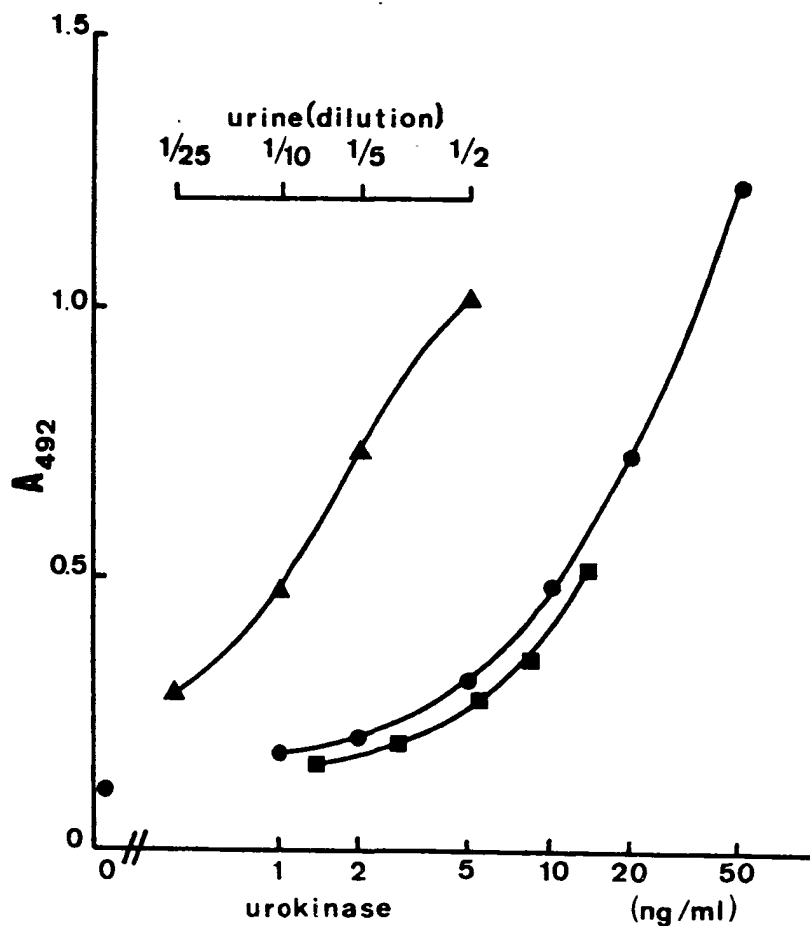


Fig. 3

Bruxelles, le 24 mars 1983.

A. BLANCHART, par procuration.