

ROYAUME DE BELGIQUE



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES



BE 1008221A

NUMERO DE PUBLICATION : 1008221A3

NUMERO DE DEPOT : 09400331

Classif. Internat. : G01N

Date de délivrance le : 20 Février 1996

**Le Ministre des Affaires Economiques,**

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 28 Mars 1994 à 24H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

## ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : ANDA BIOLOGICALS S.A.  
rue de la Course 37, F-67067 STRASBOURG CEDEX(FRANCE)

représenté(e)s par : VAN MALDEREN Michel, OFFICE VAN MALDEREN, Place Reine  
Fabiola 6/1 - B 1080 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : SUPPORT SOLIDE FIXANT AU MOINS UN COMPOSANT A ACTIVITE BIOLOGIQUE  
COMPRENANT UN SITE REACTIONNEL, STABILISE ET PROCEDE POUR SON OBTENTION.

INVENTEUR(S) : Vu Khue NGuyen, rue du Paradis 21, Wittersheim, F-67670 Mommenheim (FR); Poindron Philippe, rue André Malraux 14, Plobsheim, F-67400 Illkirch (FR); Maes R., Bildhauerhof 34, Rosheim, F-67190 Mutzig (FR)

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 20 Février 1996  
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L  
Directeur.

5

10        **SUPPORT SOLIDE FIXANT AU MOINS UN COMPOSANT A ACTIVITE**  
**BIOLOGIQUE COMPRENANT UN SITE REACTIONNEL STABILISE ET**  
**PROCEDE POUR SON OBTENTION.**

**Objet de l'invention.**

15            La présente invention concerne un support solide  
fixant au moins un composant à activité biologique comprenant  
un site réactionnel stabilisé, ainsi que son procédé  
d'obtention.

20        **Arrière-plan technologique et état de la technique à la base**  
**de l'invention.**

          Les récents développements en biologie moléculaire  
et en biochimie ont permis l'utilisation de nombreux  
composants à activité biologique dans des procédés de  
synthèse, de séparation et/ou de diagnostic.

25            Parmi ces composants à activité biologique, les  
enzymes se sont révélés de bons catalystes par leur forte  
spécificité pour leur substrat, et leur forte activité  
catalytique pouvant fonctionner dans des conditions très  
douces.

30            De même, les anticorps, les antigènes, les abzymes,  
les ribozymes, voire des microorganismes entiers (bactéries,  
virus, ...) sont notamment utilisés dans de nombreux tests  
de diagnostic ainsi que dans des procédés de synthèse ou de  
séparation.

35            Cependant, ces procédés nécessitent souvent une  
modification de la température, du pH, de la concentration  
du milieu extérieur, une dessiccation des supports, etc., ce  
qui occasionne souvent la dénaturation ou la destruction de

ces composants à activité biologique.

Parmi les composants à activité biologique, certaines molécules sont caractérisées par une conformation tridimensionnelle spécifique obtenue par l'agencement  
5 d'éléments (tels que des acides aminés, des acides nucléiques, des saccharides, des lipides, ...) et les liens pouvant exister entre ces éléments.

La dénaturation est un procédé qui induit une modification mineure ou majeure de cette conformation, sans  
10 spécialement perturber la séquence des différents éléments.

Cette dénaturation peut provoquer une diminution, voire une inactivation complète, de l'activité biologique de ces composants.

Aussi, différentes techniques ont été proposées  
15 pour stabiliser ces composants, c'est-à-dire réduire ou empêcher leur dénaturation par dessiccation, modification du pH et/ou de la pression, action de protéase, ....

Les procédés de stabilisation dans une phase liquide de composants à activité biologique (spécialement les  
20 protéines) sont bien connues depuis plusieurs années (Enzyme Stabilisation, Gianfreda and Scarfi, Mol. Cell Biochemistry 1991, 110, pp 97-128).

Parmi les différentes techniques qui sont satisfaisantes, on peut citer l'immobilisation sur phase  
25 solide, l'adjonction d'additifs, le couplage à d'autres composants, la réticulation par des agents bifonctionnels. Certaines protéines sont stabilisées par des sucres à l'état liquide, mais en général, les sucres ne stabilisent normalement les protéines sous forme soluble qu'en dessous  
30 de la température de congélation de l'eau, préféablement à -20°C ou encore moins.

Il est également connu que certaines protéines (notamment les enzymes et les anticorps) immobilisées sur une phase solide acquièrent une stabilisation souvent supérieure  
35 à celle observée lorsque ces protéines sont gardées sous forme solubilisée.

L'immobilisation de ces protéines peut être réalisée par fixation de la phase solide par liaisons

covalentes, interactions adsorptives, capture de la protéine dans un gel, sur des fibres ou des grains, couplage par des réactifs bifonctionnels et/ou encapsulation dans des microcapsules ou des membranes.

5                   Parmi les enzymes et récepteurs enzymatiques dont la dénaturation spontanée à température ambiante est très rapide se trouve l'acétylcholinestérase ainsi que le récepteur membranaire de l'acétylcholinestérase. Ces deux entités présentent un grand intérêt analytique et  
10 diagnostique pour la détection de certains types de pesticides, pour l'évaluation du taux sanguin de certains médicaments et pour le diagnostic de certaines maladies.

                  Les pesticides couramment utilisés sont de divers types, ayant tous une action inhibitrice propre sur un site  
15 réactionnel bien défini. Certains d'entre eux, appartenant au groupe des organophosphores et des carbamates, inhibent la cholinestérase, ce qui entraîne des désordres au niveau de la transmission de l'influx nerveux (myasthénie musculaire, maladie d'Alzheimer, ...).

20                   La détection des traces de pesticides contaminant les aliments destinés à la consommation animale et humaine (vins, céréales, légumes, jus de fruits, fruits, aliments pour bébés, ...) est pour l'instant basée sur la technique de chromatographie en phase gazeuse. Cette technique très  
25 performante est malheureusement extrêmement difficile à mettre en oeuvre, longue et coûteuse. De plus, elle n'autorise pas une détermination globale des pesticides incriminés, mais fait de façon directe une analyse détaillée des échantillons soumis à analyse.

30                   La demande de brevet FR-2677373 décrit une trousse de détection de pesticides de la famille des organophosphores et/ou des carbamates en milieu aqueux par une détermination colorimétrique connue depuis longtemps (A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity,  
35 Ellman et al. Biochem. Pharmacology, 1961, 7, pp 88-95). L'élément de détection des pesticides consiste en une enzyme de la famille des cholinestérases fixée selon un procédé complexe à un support solide par l'intermédiaire d'une

matrice protéique. La matrice protéique est de la gélatine dans laquelle l'enzyme est noyée, puis réticulée par un agent bifonctionnel tel que la glutaraldéhyde. Le support solide consiste en un bâtonnet fixé sur un bouchon et plongeant dans un tube test contenant un milieu aqueux constitué d'eau physiologique tamponnée à neutralité par un tampon phosphate ainsi qu'un bactériostatique. Ce bactériostatique en solution garde perpétuellement mouillée l'enzyme fixée de façon covalente au support solide par la gélatine enrobant le bâtonnet terminé par une hélice (Hélice immunostick maxisorp NUNC).

La fabrication de ces hélices enrobées de gélatine incorporant l'enzyme, nécessite que les hélices soient maintenues à 37°C dans une solution aqueuse de gélatine (incorporant l'enzyme) à 5%, puis qu'elles soient séchées. Elles sont ensuite trempées dans un bain de glutaraldéhyde à 1%, rincées à l'eau distillée, plongées dans une solution de glycine pour inactiver la glutaraldéhyde, à nouveau rincées à l'eau distillée et enfin plongées de façon définitive dans un tube test contenant une solution aqueuse tamponnée à pH 7. La température de stockage est préférentiellement 4°C.

Cependant, dans certaines applications, il est intéressant d'obtenir une enzyme ou un anticorps ou tout autre protéine dotée d'un site réactionnel attachée à la phase solide sous forme sèche.

Ceci est particulièrement le cas lorsque les composants à activité biologique dotés d'un site réactionnel sont utilisés dans des tests diagnostiques.

Ainsi, le brevet US-4,324,858 décrit une trousse de détection de pesticides comportant une cholinestérase stabilisée par l'adjonction d'un tampon switteronique et séchée sur un support solide de papier sous vide.

Des sucres sont également fréquemment utilisés pour stabiliser des composants à activité biologique (telles que des protéines) séchées.

En particulier, le lactose, le sorbitol, le sucrose et le dextrane sont incorporés au milieu de lyophilisation

de protéines, de virus et d'organismes unicellulaires tels que des bactéries. Ces sucres protègent les protéines et microorganismes durant la phase de congélation et durant le processus de lyophilisation.

5 Il est aussi connu que certains sucres sont également d'excellents agents de stabilisation de protéines lorsque ces protéines sont séchées à température ambiante. Il a été récemment montré que le tréhalose ( $\alpha$ -D glucopyranosyl- $\alpha$ -D glucopyranoside) est un excellent agent  
10 stabilisant pour les protéines séchées à température ambiante (Extraordinary Stability of Enzymes Dried in Trehalose, C.Colaço et al. Biotechnology 1992, 9, pp 1007-1013).

#### Buts de l'invention.

La présente invention vise à obtenir un support  
15 solide fixant un composant à activité biologique comprenant un site réactionnel, dont la stabilisation est améliorée.

Un but particulier de la présente invention est d'obtenir une amélioration de la stabilisation à la chaleur (dessiccation), à l'action de protéase, aux variations du pH  
20 et/ou de la pression.

Un autre but de l'invention est d'obtenir un procédé d'obtention dudit support simple, rapide et peu coûteux.

#### Éléments caractéristiques de l'invention.

25 La présente invention concerne un support solide fixant au moins un composant à activité biologique comprenant un site réactionnel stabilisé par un film protecteur aux propriétés gélifiantes.

On entend par support solide, toute structure  
30 solide sur laquelle un composant à activité biologique est susceptible d'être fixé par des liens covalents, ou des interactions adsorptives.

De tels supports solides peuvent notamment être constitués par une colonne de chromatographie, des cupules  
35 de plaques de microtitration, des billes, des gels, des fibres, et/ou tout autre support en verre, en plastique, en métal, en papier et/ou en toute autre matière.

On entend par composant à activité biologique

comportant un site réactionnel, tout molécule biologique ou groupe de molécules biologiques, ou tout microorganisme biologique, pouvant intervenir dans une réaction biologique ou biochimique spécifique.

5 De telles molécules (natives ou obtenues par des techniques de génie génétique, de génie protéinique, de génie des sucres, ...) sont par exemple des enzymes, des abzymes, des ribozymes, des séquences nucléotidiques, des antigènes, des allergènes, des hormones, des récepteurs, des anticorps,  
10 des facteurs de coagulation sanguine, des cytokines, des haptènes, ..., possédant un site réactionnel spécifique, susceptibles d'intervenir dans un procédé de détection, de synthèse et/ou de séparation d'un composant biologique ou non biologique.

15 De tels microorganismes peuvent être par exemple des virus, des organismes procaryotes ou eucaryotes unicellulaires tels que des bactéries, des levures et/ou des lignées de cellules animales ou végétales pouvant être fixées sur tout support solide, pour former par exemple un composant  
20 bioélectronique.

On entend par film protecteur aux propriétés gélifiantes, un film constitué d'une structure tridimensionnelle telle qu'un gel dans lequel le solvant est immobilisé.

25 Ce film est donc constitué d'un réseau tridimensionnel continu de macromolécules ou particules connectées dans une phase liquide continue.

Les molécules constitutives de ce réseau tridimensionnel continu peuvent être par exemple des  
30 protéines telles que la gélatine et/ou l'albumine.

De manière inattendue, la demanderesse a découvert que ce film protecteur aux propriétés gélifiantes améliore considérablement la stabilisation ( en particulier la stabilisation face à la dessiccation du support, à l'action  
35 de protéase ou aux modifications du pH et/ou de la pression, ...) d'un composant à activité biologique fixé sur un support solide sans perturber l'activité du site réactionnel du composant à activité biologique.

Avantageusement, le film protecteur aux propriétés gélifiantes comprend également un ou plusieurs saccharides, de préférence un ou plusieurs disaccharides choisis parmi le groupe constitué par le sucrose, le lactose, l'érythritol, le thréitol, le maltose, le maltotriose, le lactulose, le dextrane, le sulfate de dextrane, le DEAE-dextrane, le ficoll et/ou le tréhalose.

L'addition de saccharides au film protecteur est caractérisée de manière inattendue par un effet synergique se traduisant par une amélioration notoire de la stabilisation, en particulier lorsque lesdits supports solides sont soumis à une dessiccation à haute température.

Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, ledit film protecteur comprend également un agent bifonctionnel ou polyfonctionnel de réticulation, de préférence un agent choisi parmi le groupe constitué par le glutaraldéhyde, le diiodate, les dithiols et/ou un mélange d'entre eux.

D'autres additifs, tels que définis par Gray (Additives and Enzymes Stability, Biocatalyses 1, pp 187-196 (1988)) et Gianfreda et al. (Enzymes Stabilisation and Molecular and Cellular Biochemistry, 100, pp 97-128 (1991)) peuvent également être utilisés pour augmenter cette stabilisation.

Ces additifs peuvent notamment être des alcools polyhydriques, des solvants organiques, des polymères et/ou des composés ioniques ou non ioniques.

Avantageusement, la stabilisation du support solide selon l'invention s'observe lorsque ledit support est séché, par exemple lorsqu'il est soumis à une dessiccation à des températures élevées (de préférence comprises entre 4°C et 37°C, voire jusqu'à des températures proches de 50°C).

Un autre aspect de la présente invention concerne le composant bioélectronique, la colonne de chromatographie ou la trousse de diagnostic comportant le support solide selon la présente invention.

Un dernier aspect de la présente invention concerne le procédé d'obtention du support solide selon la présente

invention dans lequel on fixe sur un support solide, un composant à activité biologique comportant un site réactionnel, on recouvre celui-ci d'une solution comprenant un produit solubilisé aux propriétés gélifiantes, de  
5 préférence une protéine telle que la gélatine et/ou l'albumine, et on forme sur ledit support solide un film protecteur aux propriétés gélifiantes par évaporation du solvant.

Avantageusement, ladite solution comporte également  
10 un saccharide, de préférence un disaccharide, choisi parmi le groupe constitué par le sucrose, le lactose, l'érythritol, le thréitol, le maltose, le maltotriose, le lactulose, le dextrane, le sulfate de dextrane, le DEAE-dextrane, le ficoll et/ou le tréhalose.

15 La présente invention sera décrite de manière plus détaillée en référence aux exemples suivants donnés à titre d'illustration non limitative de la présente invention.

#### Exemple 1.

20 De l'acétylcholinestérase extraite du poisson torpille et purifiée par chromatographie d'affinité d'après la méthode de Hirt (Photoaffinity labelling of cholinesterases, Ehret-Sabatier et al. Eur. J. Biochem. 1992, 203, pp 475-481) est mise en solution dans un tampon  
25 carbonate 0,05 M à pH 9,6 à une concentration de 2 µg/ml et utilisée à raison de 100 µl/ml pour la sensibilisation de puits de plaques de microtitration. Après une nuit d'incubation à 4°C, les puits sont rincés puis soumis aux différents traitements suivants :

- 30 - 1. blanc (aucun ajout)  
- 2. rinçage par une solution d'eau physiologique tamponnée à pH 7 et contenant 15% en tréhalose;  
- 3. recouvrement par une solution d'eau tamponnée à pH 7 par 0,05 M phosphate et contenant 5% de gélatine (240  
35 bloom), puis élimination de la gélatine sans rinçage;  
- 4. recouvrement par une solution 5% gélatine contenant 15% de tréhalose, puis élimination de la gélatine sans rinçage.

La gélatine est solubilisée par chauffage à 47°C puis refroidie à 37°C pour sa répartition dans les puits. Les puits des plaque de microtitration ainsi traités sont placés à 4°C, 37°C et 50°C durant 7 jours dans des étuves sèches, puis analysés pour leur activité cholinestérasique, selon la technique décrite par Ellman. Les résultats sont donnés en absorbance lus à 412 nm et sont rapportés dans le tableau 1.

Tableau 1.

Activité enzymatique résiduelle après entreposage de puits sensibilisés par l'acétylcholinestérase à différentes températures durant 7 jours.

	4°C	37°C	50°C
1 Contrôle	1,72	0,42	0,05
2 Tréhalose	1,88	0,97	0,12
3 Gélatine	1,67	1,04	0,56
4 Gél. + Tréh.	1,79	1,82	1,71

On voit l'extraordinaire amélioration de la stabilité de l'enzyme lorsque les deux facteurs de stabilisation associés, film protecteur et sucre, agissent en synergie.

#### Exemple 2.

De la peroxydase de raifort (0,2 µg/ml) a été utilisée pour sensibiliser des puits de plaque de microtitration selon la même technique. Après sensibilisation des puits durant une nuit à 4°C, les puits ont été recouverts soit par une solution chaude (47°C pour la solubilisation, 37°C pour la répartition dans les puits) de gélatine à 5%, soit par une solution d'albumine à 5%, contenant l'une et l'autre de la tréhalose en concentration décroissante à partir d'une concentration de 8%. Du triton X100 à une concentration de 0,04% a été ajouté à la solution d'albumine comme agent mouillant. Les puits ont été immédiatement vidés sans rinçage, et ont ensuite été placés à 4°C et à 37°C durant 7 jours dans une étuve sèche. L'activité peroxydasique résiduelle a été mesuré par addition de 100 µl d'une solution de tétraméthylbenzidine et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans un tampon citrate-phosphate à pH 5,5. La réaction colorée bleue obtenue a été transformée en une couleur jaune sous l'action de l'acide sulfurique 0,5N ajouté pour arrêter la réaction enzymatique. Les résultats sont donnés en absorbance lus à 450 nm et sont

rapportés dans le tableau 2.

Tableau 2.

5	Tréhalose mg / ml	Gélatine		Albumine	
		4°C	37°C	4°C	37°C
	8,0	1,86	1,69	1,78	1,81
	4,0	1,78	1,74	1,79	1,73
	2,0	1,82	1,69	1,84	1,69
	1,0	1,42	0,97	1,78	1,74
10	0,5	1,13	0,48	1,67	1,43
	0	0,97	0,36	1,37	0,52

On voit que la protection accordée par le tréhalose incorporé dans le film protecteur est sensiblement la même pour l'albumine et la gélatine, avec un léger avantage pour l'albumine, sans doute parce que contrairement à la gélatine, ce film protéinique ne se ramollit pas à 37°C. Deux pour cent de tréhalose inclus dans la solution gélifiante semble être nécessaires et suffisants pour stabiliser l'enzyme immobilisée sur la phase solide.

REVENDICATIONS.

1. Support solide fixant au moins un composant à activité biologique comprenant un site réactionnel stabilisé par un film protecteur aux propriétés gélifiantes.
- 5 2. Support selon la revendication 1 caractérisé en ce que le film protecteur aux propriétés gélifiantes comprend de la gélatine et/ou de l'albumine.
- 10 3. Support selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que le film protecteur aux propriétés gélifiantes comprend un ou plusieurs saccharides, de préférence un ou plusieurs disaccharides, choisis parmi le groupe constitué par le sucrose, le lactose, l'érythritol, le thréitol, le maltose, le maltotriose, le lactulose, le dextrane, le sulfate de dextrane, le DEAE-dextrane, le ficoll  
15 et/ou le tréhalose.
4. Support selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend un agent bifonctionnel ou polyfonctionnel de réticulation.
- 20 5. Support caractérisé en ce que le composant à activité biologique est une molécule choisie parmi le groupe constitué par les enzymes, les abzymes, les ribozymes, les séquences nucléotidiques, les antigènes, les allergènes, les hormones, les récepteurs, les anticorps, les facteurs de coagulation sanguine, les cytokines, les haptènes et/ou un  
25 mélange d'entre eux.
- 30 6. Support selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 4 caractérisé en ce que le composant à activité biologique est un microorganisme, de préférence choisi parmi le groupe constitué par les virus, les bactéries, les levures et/ou les lignées de cellules animales ou végétales.
7. Support selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 6 caractérisé en ce qu'il est séché.
- 35 8. Composant bioélectronique comportant le support selon la revendication 6 ou 7.
9. Colonne de chromatographie comportant le support selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 7.

10. Trousse de diagnostic comportant le support selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 7.

11. Procédé d'obtention du support l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 7 caractérisé en ce que  
5 l'on fixe sur un support solide un composant à activité biologique comportant un site réactionnel, on recouvre celui-ci d'une solution comprenant un produit solubilisé aux propriétés gélifiantes, et on forme sur ledit support solide  
10 un film protecteur aux propriétés gélifiantes par évaporation du solvant.

12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que le produit solubilisé aux propriétés gélifiantes est une protéine, de préférence la gélatine et/ou l'albumine.

13. Procédé selon la revendication 11 ou 12  
15 caractérisé en ce que la solution comporte un saccharide, de préférence un saccharide choisi parmi le groupe constitué par le sucrose, le lactose, l'érythritol, le thréitol, le maltose, le maltotriose, le lactulose, le dextrane, le sulfate de dextrane, le DEAE-dextrane, le ficoll et/ou le  
20 tréhalose.



Office européen  
des brevets

**RAPPORT DE RECHERCHE**  
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

Numero de la demande  
nationale

BO 4991  
BE 9400331

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée
X	EP-A-0 140 489 (WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)	1-7,9-13
Y	* le document en entier * ---	8
X	EP-A-0 192 320 (UNILEVER PLC.)	1-7,9-13
Y	* le document en entier * ---	8
X	WO-A-92 08134 (COULTER CORPORATION)	1-7,9-13
Y	* le document en entier * ---	8
Y	EP-A-0 402 917 (BIOCIRCUITS CORPORATION) * abrégé; revendications * ---	8
Y	WO-A-90 05303 (PHARMACIA AB.) * abrégé; revendications * -----	8
		CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.5)
		GO1N33/543
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)
		GO1N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
14 Décembre 1994		Griffith, G
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 01.82 (P04C48)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 4991  
BE 9400331

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

14-12-1994

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0140489	08-05-85	JP-A- 60035263	23-02-85
		US-A- 5273908	28-12-93
EP-A-0192320	27-08-86	WO-A- 8604095	17-07-86
WO-A-9208134	14-05-92	US-A- 5169754	08-12-92
		AU-A- 1254392	26-05-92
		EP-A- 0556346	25-08-93
EP-A-0402917	19-12-90	US-A- 5156810	20-10-92
		CA-A- 2019039	15-12-90
		JP-A- 3128449	31-05-91
		US-A- 5268305	07-12-93
WO-A-9005303	17-05-90	SE-B- 462454	25-06-90
		EP-A- 0589867	06-04-94
		JP-T- 4501605	19-03-92
		SE-A- 8804073	10-11-88
		US-A- 5242828	07-09-93