

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 30.07.01.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 31.01.03 Bulletin 03/05.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : INSTITUT GUSTAVE ROUSSY — FR.

72 Inventeur(s) : ZITVOGEL LAURENCE, ANDRE
FABRICE et ANGEVIN ERIC.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

54 VESICULES MEMBRANAIRES DE FLUIDE BIOLOGIQUE PRELEVE IN VIVO, LEUR PREPARATION ET
UTILISATION DANS LA STIMULATION D'UNE REPONSE IMMUNITAIRE.

57 La présente invention concerne un procédé de prépa-
ration d'une suspension de vésicules membranaires isolées
à partir d'un prélèvement d'un échantillon de fluide biologi-
que, tel qu'un liquide d'ascite, chez un mammifère, notam-
ment chez l'homme et l'utilisation de ces vésicules
membranaires isolées pour charger in vitro ou in vivo des
cellules présentatrices d'antigènes, notamment des cellules
dendritiques, avec des antigènes portés par lesdites vésicu-
les membranaires et/ ou pour la stimulation in vitro ou in vivo
de lymphocytes T, cellules NK ou NKT spécifiques d'antigè-
nes portés par lesdites vésicules membranaires.

L'invention comprend également l'utilisation de telles
vésicules membranaires isolées, cellules présentatrices
d'antigènes chargés par ces vésicules ou lymphocytes T,
cellules NK ou NKT stimulées par lesdites cellules présen-
tatrices d'antigènes chargés selon l'invention pour la pré-
vention ou le traitement des cancers ainsi que pour induire
la tolérance chez un receveur d'un greffon allogénique. La
présente invention comprend en outre une méthode de dia-
gnostic de tumeur basée sur la présence et la caractérisa-
tion de telles vésicules membranaires.



La présente invention concerne un procédé de préparation d'une suspension de vésicules membranaires isolées à partir d'un prélèvement d'un échantillon de fluide biologique, tel qu'un liquide d'ascite, chez un mammifère, notamment chez l'homme et l'utilisation de ces vésicules membranaires isolées pour charger *in vitro* ou *in vivo* des cellules présentatrices d'antigènes, notamment des cellules dendritiques, antigènes portés par lesdites vésicules membranaires et/ou pour la stimulation *in vitro* ou *in vivo* de lymphocytes T, cellules NK ou NKT spécifiques d'antigènes portés par lesdites vésicules membranaires. L'invention comprend également l'utilisation de telles vésicules membranaires isolées, cellules présentatrices d'antigènes chargés par ces vésicules ou lymphocytes T, cellules NK ou NKT stimulés par lesdites cellules présentatrices d'antigènes chargés selon l'invention pour la prévention ou le traitement des cancers ainsi que pour induire la tolérance chez un receveur d'un greffon allogénique. La présente invention comprend en outre une méthode de diagnostic de tumeur basée sur la présence et la caractérisation de telles vésicules membranaires.

La présentation croisée d'antigènes permet la présentation d'un épitope d'une cellule périphérique à un lymphocyte T (appelé encore cellule T) par l'intermédiaire de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les CPA, notamment les cellules dendritiques (CD), mises en présence d'antigène, peuvent en effet *in vitro* ou *in vivo* acquérir et présenter des peptides dérivés de ces antigènes. L'immunothérapie basée sur l'utilisation des CPA, notamment les CD, a pu montrer par exemple son efficacité dans le traitement de certaines tumeurs par des études réalisées chez la souris.

Parmi les méthodes de sensibilisation de cellules dendritiques à des antigènes d'intérêt qui sont mises en oeuvre actuellement, on peut citer celles qui utilisent des peptides antigéniques correspondant à des épitopes présentés en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et identifiés par exemple dans les cellules tumorales grâce à des clones de CTLs spécifiques de la tumeur.

On peut citer par exemple le document Mayordomo et al. (Nature Medecine, Vol. 1, 12, 1297-1302, 1995), qui décrit la protection conférée à des souris contre des tumeurs létales après injection de CD dérivées de moelle osseuse préalablement

« pulsées » avec des peptides tumoraux caractérisés comme étant reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) restreint au CMH de classe I.

On peut citer également le document Zitvogel et al. (Nature Medecine, Vol. 4, 5, 594-600, 1998) qui décrit la régression de tumeurs établies chez des souris par injection d'exosomes isolés de CD syngéniques préalablement chargées avec des peptides isolés de tumeur.

Cependant, ces méthodes ne sont vraisemblablement pas optimales car :

- soit, elles ne tiennent pas compte des épitopes reconnus dans le contexte des molécules de classe II qui sont critiques pour la prolifération des lymphocytes T auxiliaires nécessaires à l'obtention des réponses cytotoxiques optimales ;

- soit, des épitopes présentés par les cellules tumorales et ceux présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (comme par exemple les cellules dendritiques), qui ne sont probablement pas les mêmes ; et

- enfin, dans la majorité des tumeurs, des antigènes spécifiques n'ont pas été identifiés. En effet, des antigènes spécifiques de la tumeur sont seulement connus dans des cas de tumeurs induites par des virus (carcinome du col utérin), dans des cas de mélanome (antigènes du soi, antigènes mutés, antigènes de différenciation) ou dans un petit pourcentage de tumeurs du sein (oncogènes, ou produits de gènes suppresseurs de tumeur ayant subi des mutations). Ainsi, des peptides isolés dérivés d'antigènes tumoraux reconnus par les CTL sont seulement disponibles pour un nombre limité de tumeurs et souvent pour un petit pourcentage de patients ayant des molécules de classe I d'haplotype approprié.

Parmi les méthodes de sensibilisation de cellules dendritiques à des antigènes d'intérêt qui sont mises en oeuvre actuellement, on peut citer également celles qui utilisent des exosomes sécrétés par des cellules tumorales issues de culture de lignées cellulaires. Les exosomes sécrétés par les cellules tumorales (désignés ci-après « Tex » ou « texosomes ») sont des vésicules de 60 à 90 nm contenant en particulier des antigènes tumoraux, des molécules de classe I et/ou II du CMH et des protéines de choc thermique (« Heat Shock Protein » ou HSP). Les Tex issus de lignées cellulaires tumorales sont ainsi des sources d'antigènes tumoraux qui ont été utilisés pour le chargement de cellules présentatrices d'antigènes *in vitro* ou *in vivo*.

Parmi les documents de l'art antérieur décrivant de telles sources d'antigènes et méthodes de chargement de cellules présentatrices d'antigènes à partir de ces sources issues de lignées cellulaires tumorales, on peut notamment citer :

- la demande de brevet internationale publiée sous le numéro WO 99/03499 qui
5 décrit un procédé de préparation de texosomes isolés à partir de culture de lignées cellulaires tumorales et l'utilisation de ces texosomes pour charger des cellules dendritiques et obtenir des lymphocytes T dirigés spécifiquement contre des antigènes contenus dans les texosomes ; et
- le document Wolfers et al. (Nature Medicine, vol. 7, 3, 297-303, 2001) qui
10 décrit la régression de tumeurs établies chez des souris par injection de cellules dendritiques syngéniques préalablement chargées avec des texosomes isolés à partir de culture de lignées cellulaires tumorales.

Néanmoins, ces sources antigéniques lorsqu'elles proviennent de lignées cellulaires tumorales, nécessitent la culture dans du sérum de cellules tumorales
15 généralement collectées à partir de fluides d'ascites tumoraux, culture difficile à réaliser et qui aboutit généralement à une population cellulaire hétérogène dont le répertoire antigénique n'est plus représentatif du répertoire de la population initiale de cellules tumorales issues du fluide d'ascite prélevé.

Ainsi, un des inconvénients de l'utilisation des lignées cellulaires réside dans
20 l'utilisation de sérum, le caractère aléatoire de l'expansion cellulaire et surtout le fait que les lignées, par la survenue de mutations spontanées, ne représentent pas forcément le répertoire antigénique des cellules tumorales du patient.

D'autre part, l'utilisation de lignées cellulaires pour produire du matériel antigénique (corps apoptotiques ou exosomes) n'exploite pas l'apport potentiel d'un
25 ligand pouvant favoriser la captation et la présentation croisée de l'antigène par la cellule présentatrice d'antigène, notamment la cellule dendritique. En effet, il a déjà été rapporté que des protéines comme les immunoglobulines permettent l'acquisition de matériel antigénique par la cellule dendritique.

Enfin, il serait avantageux de pouvoir disposer de matériel antigénique en
30 quantité plus importante que celle obtenue à partir de culture de lignées cellulaires.

Il existe donc un réel besoin de pouvoir disposer de méthodes de sensibilisation de CPA avec de nouvelles sources quantitativement plus importantes d'antigènes

tumoraux présentant l'avantage essentiel d'être à la fois représentatives du répertoire antigénique de la tumeur du patient et d'exploiter en outre la présence potentielle d'un ligand naturel permettant la captation de l'antigène par les CPA, notamment les cellules dendritiques, ceci afin d'augmenter l'efficacité de ces approches et d'élargir leurs applications, ainsi que d'élaborer de nouveaux moyens de vectorisation d'antigènes ou autres molécules.

Appliquée à l'immunothérapie antitumorale, la méthode de sensibilisation idéale des CPA, notamment des cellules dendritiques, serait que cette méthode puisse être appliquée à n'importe quelle tumeur avec un risque minimal d'immunosélection, ne devant pas être restreinte à un petit nombre d'antigènes tumoraux identifiés et dans laquelle il n'est pas nécessaire que les antigènes tumoraux soient connus. De même, une telle méthode devrait pouvoir utiliser des antigènes protéiques intacts plutôt que des peptides, afin de permettre à la cellule dendritique de les préparer et de présenter la combinaison adéquate de peptides en association avec les molécules du CMH de classe I et de classe II, et cela pour tout individu.

Ceci est justement l'objet de la présente invention.

Les inventeurs ont de manière surprenante mis en évidence dans les exemples ci-après que la purification de vésicules membranaires réalisée à partir de prélèvements effectués chez un mammifère, notamment chez l'homme, permettait d'obtenir non seulement une quantité plus importante de ces vésicules (environ 20 fois plus à volume égal) mais également une source d'antigènes présentant les avantages décrits ci-avant par rapport à des vésicules membranaires purifiées à partir de cultures de lignées cellulaires humaines.

De plus, le procédé de préparation de vésicules membranaires réalisée à partir de prélèvements effectués chez un mammifère selon l'invention ci-après décrite est un procédé rapide qui ne nécessite pas de cultures cellulaires préalable, souvent longues et fastidieuses, pas toujours possible, et requises pour la préparation de vésicules membranaires purifiées à partir de cultures de lignées cellulaires humaines.

Les inventeurs ont effet mis en évidence que les vésicules membranaires isolées directement à partir de fluide biologique d'un mammifère, notamment humain, contenant des cellules capables de sécréter de telles vésicules membranaires, telles que

les cellules tumorales, sont plus nombreuses et présentent des propriétés immunogènes particulièrement avantageuses par rapport aux texosomes issus de lignées cellulaires tels que décrits par exemple dans le document WO 99/03499.

Ces vésicules membranaires correspondent à une vésicule interne contenue dans
5 un endosome d'une cellule vivante en division et sécrétée par ladite cellule suite à la fusion de la membrane externe dudit endosome avec la membrane cytoplasmique de la cellule dont il est issu. En raison de ce mécanisme de formation, de leur cellule d'origine et de leurs caractéristiques et propriétés fonctionnelles originales, ces vésicules sont désignées dans ce qui suit par le terme général « vésicule membranaire » ou
10 « exosome » et en particulier par le terme "texosome" lorsque la cellule dont la vésicule membranaire est issue est une cellule tumorale.

La présente invention a donc pour objet un procédé de préparation de vésicules membranaires, ou d'une suspension de vésicules membranaires, lesdites vésicules membranaires étant isolées de leur environnement naturel, caractérisé en ce qu'il
15 comprend les étapes suivantes :

- a) le prélèvement *in vivo* d'un échantillon chez un mammifère, notamment chez l'homme, ledit échantillon étant un fluide biologique, ou un échantillon capable de libérer un fluide biologique contenant en suspension des vésicules membranaires et/ou des cellules capables de produire de telles vésicules membranaires par
20 exocytose ;
- b) l'isolement *in vitro* desdites vésicules membranaires à partir dudit échantillon prélevé.

La sécrétion de vésicules membranaires par certains types de cellules de mammifère est un phénomène décrit dans l'art antérieur (tels que par les cellules de type
25 réticulocyte, lymphocytes B, CPA, comme les macrophages ou les cellules dendritiques, ou encore les cellules tumorales). Ces vésicules membranaires sont généralement désignées par le terme générique "exosome" qui reflète leur mécanisme de production par exocytose de vésicules internes. Cependant, le rôle physiologique de ces vésicules n'a pas été vraiment établi. De plus, les caractéristiques structurales, les propriétés et les
30 fonctions de ces vésicules sont variables selon le type cellulaire dont elles sont issues.

Par l'expression "isolée de son environnement naturel", on entend désigner ici que la vésicule membranaire est au moins séparée de la cellule dont elle est issue par un

traitement physique de l'échantillon du fluide biologique prélevé. Généralement, ladite vésicule membranaire préparée par le procédé selon l'invention est au moins partiellement isolée et/ou purifiée de manière à obtenir une composition ou suspension enrichie en vésicules membranaires, dépourvue de cellules intactes et de débris
5 cellulaires.

Selon un mode de réalisation avantageux, le prélèvement de l'échantillon de fluide biologique, ou capable de libérer un fluide biologique, contenant en suspension des vésicules membranaires et/ou des cellules capables de produire de telles vésicules membranaires par exocytose est un prélèvement *in vivo* d'échantillon de fluide choisi
10 parmi les fluides biologiques suivants : un fluide abdominal, un fluide péritonéal, un fluide pleural, un fluide encéphalo-céphalorachidien (LCR), du sang total, du plasma, du sérum ou de l'urine ; ou un prélèvement *in vivo* d'échantillon de tissu ou d'organe capable de libérer après traitement *ex vivo* dudit échantillon prélevé (lorsqu'il s'agit en particulier d'échantillon de tumeur solide).

15 Selon un mode de réalisation avantageux, le prélèvement de l'échantillon de fluide biologique contenant en suspension des vésicules membranaires et/ou des cellules capables de produire de telles vésicules membranaires par exocytose est un prélèvement d'échantillon de fluide, ou d'échantillon capable de libérer un fluide, choisi parmi les fluides exsudatifs ou transsudatifs, notamment de fluide exsudatif ou transsudatif
20 prélevé dans une cavité et résultant d'une réaction inflammatoire, d'un phénomène de cancérisation ou d'une transplantation.

Selon un mode de réalisation particulier, ledit fluide transsudatif prélevé dans une cavité, notamment péritonéale, pourra résulter d'une inflammation provoquée par un pré-traitement de la cavité comprenant la mise en contact de cette cavité avec un
25 agent chimique abrasif (irritant), ou encore par le pré-traitement par chimiothérapies de ladite cavité, ou encore par transfert de gènes suicides, comme le gène codant pour la TK (Thymidine Kinase) en utilisant par exemple le virus de l'Herpes Simplex (HSV).

Par fluide « exsudatif » ou « exsudat », on entend désigner ici un fluide échappé d'un tissu, comme un liquide d'ascite, ou de vaisseaux sanguins contenant des cellules
30 et/ ou débris cellulaires, et que l'on peut trouver dans un tissu ou à sa surface, et qui résulte habituellement d'une inflammation, d'un phénomène de cancérisation ou d'un phénomène de rejet suite à une transplantation (fluide dont la concentration protéique

est supérieure à 40 g/l, et dont la pression est égale à la pression osmotique ou hyperosmotique).

Par fluide « transsudatif » ou « transsudat », on entend désigner ici un fluide d'origine plasmatique ayant traversé une membrane ou un fluide extrudé d'un tissu dans lequel est accumulé un tel fluide (par exemple lors d'un œdème) et qui peut résulter également d'une hyperpression vasculaire (fluide dont la concentration protéique est inférieure à 30 g/l, et dont la pression est hypo-osmotique contenu protéique < 30 g/l).

Lorsque le fluide biologique est un fluide, ou un échantillon capable de libérer un fluide, contenant en suspension des vésicules membranaires sécrétées par des cellules tumorales et/ou des cellules tumorales capables de produire des vésicules membranaires, le prélèvement de l'échantillon peut être :

- un prélèvement du liquide d'ascite tumoral ou, en général, d'une effusion de la tumeur ; ou
- un prélèvement de sang efférent de la veine de l'organe tumoral ciblé ; ou
- le produit de drainage d'un organe porteur de tumeurs excisé chirurgicalement et traité *ex vivo* par circuit isolé perfusé pour le drainage de la tumeur qu'il porte, ou encore
- le surnageant d'un explant tumoral prélevé *in vivo* et dissocié mécaniquement *in vitro*.

Lorsqu'il s'agit d'un prélèvement de sang efférent de l'organe tumoral ciblé, ce prélèvement sera par exemple un échantillon d'environ 20 à 50 ml de sang de la veine principale efférente de l'organe tumoral, prélevé avant l'intervention d'ablation chirurgicale de la tumeur si cette ablation devait être réalisée.

Le produit de drainage d'un organe porteur de tumeurs excisé chirurgicalement et traité *ex vivo* par circuit isolé-perfusé peut être obtenu de la façon suivante dans le cas d'organe présentant une artère afférente et une veine efférente :

- on caractérise l'artère par une tubulure plastique branchée à une poche proclive contenant du sérum physiologique avec éventuellement d'autres agents ; puis
- on draine l'organe et le fluide biologique ressort par une autre tubulure cathétérisant la veine, en déclive (par exemple dans le cas du cancer du rein, ou d'un glioblastome cérébral).

Le surnageant d'un explant tumoral dissocié *in vitro* peut être obtenu dissociation mécanique de la tumeur conduisant généralement à une suspension unicellulaire contenant des cellules tumorales, des cellules du stroma tumoral et des cellules du système immunitaire.

5 Dans un mode de réalisation particulier, le fluide biologique directement prélevé *in vivo*, ou obtenu à partir de l'échantillon prélevé *in vivo* pourra être congelé puis décongelé avant l'étape b) d'isolement des vésicules membranaires du procédé selon l'invention.

10 Parmi les fluides biologiques, ou échantillons capables de libérer un fluide biologique, contenant en suspension des vésicules membranaires sécrétées par des cellules tumorales et/ou des cellules tumorales capables de produire des vésicules membranaires, on peut citer notamment :

- les échantillons de tumeurs solides ou d'effusion de ces tumeurs telles que celles observées dans le cancer du rein, du sein, du côlon, du poumon, de l'estomac, du
15 foie, les mélanomes, les sarcomes, etc. ;
- les échantillons de fluide biologique issu de tumeur hématopoïétique telle que les leucémies, les lymphomes malins hodgkiniens ou non hodgkiniens ;
- les échantillons de fluide d'ascite tumoral , de fluide pleural, de LCR ou d'urine.

20 Le terme "cellules tumorales" englobe de manière générale toute cellule provenant d'une tumeur, par exemple une tumeur solide ou liquide. Il s'agit de préférence d'une tumeur solide, ascitique ou hématopoïétique.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, le prélèvement de l'échantillon de fluide biologique est un prélèvement d'échantillon de fluide d'ascite.

25 Par fluide ou liquide « d'ascite », on entend désigner ici un fluide que l'on peut trouver par exemple dans la cavité abdominale, péritonéale ou pleurale d'un mammifère et qui résulte habituellement d'une effusion résultant d'une inflammation, d'une tumeur ou d'une hypertension veineuse.

Selon un mode de réalisation encore plus particulièrement avantageux, le
30 prélèvement de l'échantillon de fluide biologique est un prélèvement *in vivo* d'échantillon de fluide d'ascite tumoral de patient atteint d'un cancer.

Dans un mode particulier de mise en oeuvre du procédé de l'invention, l'échantillon de fluide biologique prélevé *in vivo*, ou obtenu à partir du prélèvement *in vivo*, peut être traité le cas échéant avant l'étape b) d'isolement *in vitro* desdites vésicules membranaires par un ou plusieurs agents stimulant la production de vésicules membranaires, notamment de texosomes s'il s'agit de vésicules membranaires dérivées de cellules tumorales. Ce traitement peut comprendre par exemple, lorsqu'il s'agit de fluides tumoraux, l'addition d'agents stéroïdes (dexaméthasone par exemple qui a pour but d'augmenter le stress cellulaire et l'exocytose des texosomes hors de la cellule tumorale), d'agents pharmacologiques (par exemple des agents cytotoxiques tels que taxanes, cisplatine, etc.), d'agents susceptibles d'augmenter la quantité d'endosomes multivésiculaires et/ou une irradiation de l'échantillon.

S'agissant de l'irradiation, elle doit être suffisante pour provoquer l'action cytostatique des cellules tumorales contenues dans l'échantillon prélevé. L'irradiation des cellules tumorales doit être faite quand les cellules tumorales sont vivantes, c'est-à-dire :

- soit sur le fluide biologique contenant les cellules tumorales en suspension,
 - soit sur l'organe excisé porteur de tumeur avant la perfusion,
 - soit sur la suspension cellulaire obtenue après dissociation mécanique de la tumeur ;
- mais, dans tous les cas, avant souffrance cellulaire tumorale pour cause d'hypoxie et/ou nécrose vasculaire et/ou déshydratation.

S'agissant du traitement à l'aide de stéroïdes, il permet de provoquer une activation cellulaire conduisant à l'exocytose des texosomes.

S'agissant du traitement à l'aide d'agents pharmacologiques, il permet de :

- modifier le cytosquelette et réarranger les compartiments intracellulaires pour dérégler les phénomènes d'internalisation et d'exocytose, ou
- dépolymériser les microtubules.

Un procédé avantageux de préparation de texosomes selon l'invention à partir du fluide biologique prélevé *in vivo* contenant une suspension de cellules tumorales comprendra après l'étape a) de prélèvement *in vivo* de l'échantillon l'étape suivante :

- une irradiation, à une intensité suffisante pour provoquer l'action cytostatique des cellules tumorales et ne dépassant pas 15.000 rads avantageusement à environ 10.000 rads, de la suspension de cellules tumorales ; ou

- un traitement de la suspension de cellules tumorales, à l'aide de stéroïdes, par exemple de dexaméthasone, ou d'agents cytotoxiques, par exemple du 5-fluorouracile (5 Fu) ou cis-platine, docétaxel, anthracycline, poison du fuseau, antipyrimidique, ou d'interleukine par exemple IL-10, IL-2, IL-15, GM-CSF ; ou

- un traitement avec un agent susceptible d'augmenter la quantité d'endosomes multivésiculaires, par exemple le nocodazole (Gruenberg et al., Journal of Cell Biology, 108:1301-1316, 1989) et donc d'augmenter la production de texosomes.

Un procédé également avantageux de préparation de texosomes selon l'invention :

- soit à partir d'un prélèvement de sérum physiologique drainant un organe excisé chirurgicalement et traité *ex vivo* par circuit isolé-perfusé pour le drainage de la tumeur qu'il porte, ou

- soit à partir du surnageant d'un explant tumoral dissocié *in vitro* comprendra après l'étape a) de prélèvement *in vivo* de l'échantillon l'étape suivante :

- un traitement à l'aide de stéroïdes, par exemple de dexaméthasone, ou d'agents cytotoxiques, par exemple du 5-fluorouracile (5-Fu) ou cis-platine, taxanes, ou d'interleukine par exemple IL-10, IL-2, GM-CSF.

L'invention concerne également l'utilisation d'un texosome tel que défini ci-dessus, ou d'une cellule présentatrice d'antigène telle que définie ci-dessus, ou d'un dexosome tel que défini ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de tumeurs, notamment solides, ascitiques et hématopoïétiques.

Selon un mode de réalisation préféré, l'étape b) d'isolement des vésicules membranaires est effectuée par centrifugation, électrophorèse, chromatographie et/ou nanofiltration, ou encore par capture à l'aide de billes couplées à des anticorps dirigés spécifiquement contre des protéines exprimée à la surface externe de ces vésicules.

L'isolement des vésicules membranaires à l'étape b) du procédé selon la présente invention peut être réalisé selon différentes techniques de séparation de matériels biologiques. Ces techniques sont généralement basées sur les différences de taille, de masse, de charge, de densité ou sur les propriétés immunologiques (i.e. reconnaissance

spécifique d'anticorps) des vésicules membranaires par rapport aux autres éléments contenus dans le fluide biologique.

Parmi ces techniques, on préfère la technique d'isolement par centrifugation du fluide biologique prélevé *in vivo*, ou obtenu à partir de l'échantillon prélevé *in vivo*. Il
5 peut s'agir par exemple d'une centrifugation différentielle et/ou d'une centrifugation en gradient de densité, suivie(s) d'une récupération de la ou des fraction(s) contenant lesdites vésicules membranaires. Ce type de méthodologie repose sur la séparation, par centrifugations successives, des vésicules membranaires d'une part et des cellules, débris cellulaires, vésicules internes, etc., d'autre part. Dans ce mode particulier de mise
10 en oeuvre, la fraction comprenant les vésicules membranaires est généralement celle obtenue après ultracentrifugation à 100.000 g. Cette méthode est illustrée notamment dans les exemples ci-après.

L'étape d'isolement des vésicules membranaires peut également être réalisée par chromatographie, électrophorèse et/ou nanofiltration, ou encore par capture sur billes
15 revêtues d'anticorps spécifiques.

Il peut s'agir avantageusement d'une électrophorèse en phase fluide et/ou en gradient de densité, que l'on pourra, le cas échéant, réaliser sur le surnageant obtenu après une première ultracentrifugation différentielle du fluide biologique. L'électrophorèse en phase fluide, qui permet la séparation de matériels biologiques
20 d'après leur charge, est tout à fait avantageuse. Pour cette technique, on pourra avantageusement se référer à l'exemple 11, page 58, du document WO 99/03499 montrant que cette technique peut être utilisée pour l'isolement de vésicules membranaires avec de bons rendements. Cette technique est par ailleurs particulièrement avantageuse sur le plan industriel.

Il peut également s'agir d'une purification par chromatographie. On peut citer notamment les chromatographies d'échanges d'ions, de perméation de gel (ou d'exclusion) ou la chromatographie hydrophobe. Compte tenu de la nature lipidique des vésicules membranaires, la chromatographie d'échanges d'ions est particulièrement intéressante. La nanofiltration peut être réalisée selon les techniques connues, à partir du
30 fluide biologique, de préférence à partir d'un surnageant obtenu après une première ultracentrifugation différentielle.

Le recours à ces techniques de chromatographie et/ou d'électrophorèse et/ou de nanofiltration permet, notamment par rapport aux technologies courantes de centrifugation, une production de qualité améliorée, dans des quantités adaptées à un usage industriel (notamment pharmacologique).

5 A cet égard, l'invention concerne également un procédé de préparation de vésicules membranaires comprenant au moins à l'étape b) d'isolement du procédé selon l'invention une étape de séparation par électrophorèse, chromatographie ou nanofiltration. Un tel procédé sera donc plus particulièrement adapté à la préparation de vésicules membranaires répondant aux normes qualitatives requises pour une
10 administration thérapeutique.

Selon un mode de réalisation également avantageux, les vésicules membranaires obtenues à l'étape b) du procédé selon l'invention pourront être conservées congelées, de préférence à une température inférieure ou égale à -80°C , puis décongelées avant utilisation.

15 Sous un autre aspect, la présente invention est relative à des vésicules membranaires isolées de leur environnement naturel susceptibles d'être obtenues par le procédé selon l'invention tel que décrit ci-avant, notamment sous forme congelée.

De manière préférée, lesdites vésicules membranaires selon la présente invention sont caractérisées en ce qu'elles contiennent en majorité des vésicules membranaires de
20 diamètre compris entre 30 et 150 nm, de préférence entre 50 et 100 nm et entre 60 et 90 nm.

De manière également préférée, lesdites vésicules membranaires selon la présente invention sont caractérisées en ce que la flottation de ces vésicules est obtenue pour une densité comprise entre 1,14 et 1,18 g/ml en gradient de sucre, notamment
25 pour les vésicules membranaires issues de cellules tumorales.

De manière plus préférée, lesdites vésicules membranaires selon la présente invention sont caractérisées en ce qu'elles portent des molécules impliquées dans la présentation d'antigènes, notamment des molécules du CMH de classe I et/ou II, et/ou des molécules chaperonnes de type HSP et/ou des antigènes, notamment tumoraux,
30 et/ou des molécules d'adhésion capables de cibler les CPA et/ou des molécules de type tétraspane associées de classe I ou II aux molécules du CMH de classe I ou II.

Parmi les molécules de type HSP, on peut citer notamment la HSP 70, la HSP 80 ou la HSP 90.

Parmi les molécules d'adhésion ou de ciblage, on peut citer notamment les isoformes de la lactadhérine et les immunoglobulines humaines (notamment de type 5 IgG).

Parmi les molécules de type tétraspane associées au CMH, on peut citer la molécule CD63, molécule intervenant dans la co-stimulation lymphocytaire.

De manière plus préférée, lesdites vésicules membranaires selon la présente invention sont caractérisées en ce qu'elles ne portent pas de glycoprotéine gp96.

10 De manière générale, l'objet de l'invention concerne une vésicule membranaire isolée d'un prélèvement *in vivo* chez un mammifère d'un échantillon de fluide biologique, notamment d'ascite, de préférence tumoral, ou d'un échantillon capable de libérer un tel fluide, ayant les caractéristiques suivantes :

- elle est débarrassée de son environnement naturel,
- 15 - elle comprend en surface une bicouche lipidique qui entoure une fraction cytosolique,
- elle présente sur sa surface des molécules du CMH de classe I et/ou de classe II, éventuellement chargées en peptides antigéniques, notamment tumoraux, et/ou des molécules d'adhésion et/ou des molécules de co-stimulation lymphocytaire, et/ou,
- 20 - elle contient dans sa fraction cytosolique des molécules antigéniques, notamment, tumorales, et/ou des immunomodulateurs et/ou chémo-attracteurs et/ou hormones et/ou des acides nucléiques.

De manière préférée, lorsqu'il s'agit de vésicule membranaire issue de cellules tumorales, la vésicule membranaire (texosome) de l'invention est constituée par un 25 texosome tel qu'isolé par un procédé de l'invention défini ci-dessus et présentant sur sa surface des molécules du CMH de classe I et/ou II, éventuellement chargées en peptides antigéniques et contenant dans sa fraction cytosolique des molécules antigéniques tumorales.

De manière également préférée, lorsqu'il s'agit de vésicule membranaire issue 30 de cellules tumorales, les vésicules membranaires (texosomes) de l'invention présentent des molécules du CMH de classe I et/ou II chargées en peptides antigéniques et/ou expriment des molécules d'adhésion et/ou expriment des molécules de co-stimulation

lymphocytaire, mais sont dépourvues, dans leur fraction cytosolique, de molécules antigéniques tumorales et d'immunomodulateurs et d'acides nucléiques.

De manière également préférée, les texosomes de l'invention sont tels que les molécules du CMH de classe I et/ou II sont "vides", c'est-à-dire non chargées de peptides antigéniques et les texosomes comprennent, dans leur fraction cytosolique, des molécules antigéniques tumorales, des immunomodulateurs et/ou des acides nucléiques. Des texosomes ayant des molécules du CMH vides peuvent être obtenues par élution à l'acide à pH 2 à 4 des texosomes afin d'éluer les peptides associés aux molécules du CMH.

De manière également préférée, les texosomes de l'invention sont tels que les molécules du CMH de classe I et/ou II sont chargées en peptides antigéniques et/ou expriment des molécules d'adhésion et/ou de ciblage, et/ou en molécules de co-stimulation lymphocytaire et les texosomes contiennent dans leur fraction cytosolique des molécules antigéniques tumorales, des immunomodulateurs et/ou des acides nucléiques.

Parmi les molécules d'adhésion et/ou de ciblage cellulaire, on peut citer notamment les molécules CD11b, les tétraspanes, les différentes isoformes de la lactadhérine ou encore des immunoglobulines, notamment de type IgG, qui s'associent aux récepteurs Fc gamma présents sur les cellules cibles, ou encore des récepteurs Fc gamma (Cassard et al., Immunol. Lett., 75 (1), 1-8, 2000).

Bien entendu, ces molécules antigéniques tumorales susceptibles d'être contenues dans la fraction cytosolique ou peptides antigéniques susceptibles de charger les molécules du CMH pourront être spécifiques du caractère cancéreux et du type de tissu de la cellule dont est issue ladite vésicule membranaire. Les molécules antigéniques tumorales présentées à leur surface par les texosomes ou contenues dans leur cytosol proviendront en général de protéines exprimées de façon sélective et/ou abondante par les cellules tumorales.

On peut citer, à titre d'exemple comme molécules antigéniques tumorales susceptibles d'être contenues dans la fraction cytosolique ou comme peptides antigéniques susceptibles de charger les molécules du CMH de classe I et/ou II, ceux provenant de mélanomes tels que : MART-1, tyrosinase, MAGE-1-12, P53 (exprimés dans différentes tumeurs) ou Her2/Neu, PSA, CEA ou encore PSMA. D'autres antigènes

tumoraux sont cités par exemple dans l'article de Rosenberg et al. (Immunology Today, 18, 175, 1997) incorporé à la présente par référence.

Par molécules de co-stimulation lymphocytaire, on désigne par exemple des molécules qui donnent aux lymphocytes T des signaux complémentaires à ceux donnés
 5 lors de l'interaction des molécules du CMH de classe I et II - peptide avec le récepteur des cellules T.

On peut citer, à titre d'exemple :

CD63, CD80, CD86, ICAM, LFA, CD40, certains membres de la famille TNF R et des molécules d'adhésion ou de chemo attraction (permettant le contact entre la cellule
 10 professionnelle présentatrice d'antigène et les lymphocytes effecteurs, ou le transport intracellulaire/localisation spécifique ("trafficking/homing") d'autres cellules au site vaccinal ou inflammatoire.

Les immunomodulateurs qui peuvent être présents dans le cytosol des texosomes sont par exemple : le TNF- α , l'IL- 1, l'IL-15 ou une C-CR (chémokine).

15 Les acides nucléiques susceptibles d'être présents dans le cytosol des texosomes proviennent de la cellule tumorale elle-même. Ces acides nucléiques se trouvent dans le cytosol des texosomes en conséquence directe de leur mécanisme de formation.

Dans un mode de réalisation particulier, des acides nucléiques ou protéines hétérologues pourront être introduits dans lesdits texosomes, notamment par
 20 électroporation, par fusion avec un liposome synthétique, par virus recombinant ou par méthode chimique.

Des caractéristiques plus particulières des texosomes de l'invention sont les suivantes :

- ce sont de petites vésicules membranaires de diamètre compris entre 30 et 150
 25 nm, de préférence entre 50 et 100 nm et entre 60 et 90 nm sécrétées par les cellules tumorales,

- ils contiennent des antigènes tumoraux, comme par exemple MART-1 dans le cas de cellules de mélanome,

- ils sont dépourvus de cellules mortes, et/ou débris cellulaires,

30 - ils sont dépourvus de contaminants tels que contaminants membranaires, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries ou constituants de noyaux,

- ils portent à leur membrane des molécules de classe I et/ou II fonctionnelles chargées de peptides antigéniques tumoraux,
- ils peuvent stimuler *in vitro* la prolifération de lymphocytes T spécifiques,
- ils peuvent sensibiliser *in vivo* et *in vitro* des cellules dendritiques autologues
- 5 capables ensuite d'activer des cellules T autologues spécifiques de la tumeur,
- ils portent des molécules d'adhésion de type lactadhérine,
- ils portent des molécules de type tétraspane CD63 associé au CMH de classe II,
- ils contiennent la protéine HSP70 et/ou HSP80, et
- ils sont dépourvus de la protéine gp96.

10 Les techniques d'analyses permettant de vérifier que lesdites vésicules membranaires selon l'invention expriment ou n'expriment pas les marqueurs moléculaires attendus, tels que la présence d'HSP, CD63, molécules du CMH de classe I et/ou II, des antigènes spécifiques de tumeurs, ou encore la non présence de gp96, sont bien connus de l'homme de l'art et ne seront pas ici développés ici de manière

15 exhaustive. On pourra par exemple se référer à la technique utilisant la microscopie électronique et l'immunoempreinte (technique de Western Blotting) à l'aide d'anticorps spécifiques de ces différents marqueurs telle que décrite dans les exemples ci-après ou dans les exemples 2 et 3 et à la figure 2 du document WO 99/03499.

Un test permettant de vérifier que les texosomes selon l'invention portent à leur

20 membrane des molécules de classe I et/ou II fonctionnelles chargées de peptides antigéniques tumoraux consiste en une présentation antigénique à des lymphocytes T spécifiques des antigènes de la tumeur concernée (comme par exemple les tests de prolifération de clones T spécifiques d'antigènes et CMH classe I restreints tels que décrits dans les exemples ci-après ou à l'exemple 4 du document WO 99/03499).

25 On peut également utiliser un test de sécrétion de cytokines (IFN γ , GM, CSF, TNF α) par les clones T sus-cités décrits dans les exemples ci-après ou à la figure 3 du document WO 99/03499).

Un test permettant de vérifier qu'il y a sensibilisation *in vivo* ou *in vitro* des cellules dendritiques capables d'activer des cellules T spécifiques de la tumeur est donné

30 dans les exemples ci-après (test de prolifération et/ou sécrétion de cytokines par les clones T spécifiques d'antigènes, par la méthode de sensibilisation croisée ("cross-priming") : texosomes d'une tumeur MART-1+, HLA-A2-chargés sur une cellule

dendritique MART-1-, HLA-A2+), tel que décrit dans les exemples ci-après ou à la figure 5 du document WO 99/03499).

Un test permettant de vérifier que les texosomes selon l'invention présentent la capacité, lorsqu'ils sont inoculés, notamment en intradermique, de faire régresser des tumeurs solides établies est donné à l'exemple 6 et aux figures 6A, 6B, et 7 du document WO 99/03499.

A titre d'exemple, on pratique une injection de 10 à 40 µg de texosomes isolés de fluide ascitique tumoral en intradermique du côté homolatéral à la tumeur établie depuis 3 à 10 jours ; on observe l'animal porteur de la tumeur et la disparition progressive de la tumeur établie en 7 à 10 jours (chez les rongeurs de type souris).

Sous un autre aspect, la présente invention comprend l'utilisation de vésicules membranaires selon l'invention pour le chargement et/ou l'activation (stimulation) *in vitro* ou *in vivo* de cellules présentatrices d'antigènes, notamment de cellules dendritiques.

Par « cellules présentatrices d'antigènes » ou CPA, on entendra désigner tout particulièrement les macrophages, monocytes ou cellules dendritiques. Il s'agira avantageusement dans la présente invention de cellules dendritiques.

De manière préférée, lesdites vésicules membranaires et lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont autologues ou syngéniques.

Par « autologue », on entend désigner que les deux compositions sont issues du même individu.

De manière également préférée, lesdites vésicules membranaires et lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont allogéniques.

Par « allogénique », on entend désigner que les deux compositions sont issues d'individus présentant une variation génétique (en général, à l'intérieur d'une même espèce).

L'invention concerne également l'utilisation de vésicules membranaires selon l'invention pour la stimulation *in vitro* ou *in vivo*, et, le cas échéant, l'amplification (équivalent ici à prolifération ou expansion) ou l'anergisation *in vitro* ou *in vivo* de lymphocytes T, ou encore pour la stimulation *in vitro* ou *in vivo*, et, le cas échéant, l'amplification de cellules NK ou NKT spécifiques d'antigènes contenus dans lesdites vésicules membranaires.

De manière préférée, lesdites vésicules membranaires et lesdits lymphocytes T cellules NK ou NKT sont autologues ou syngéniques.

De manière également préférée, lesdites vésicules membranaires et lesdits lymphocytes T, cellules NK ou NKT sont allogéniques.

5 Sous un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'une vésicule membranaire selon l'invention, pour le transfert de matériel biologique dans une cellule *in vitro* ou *in vivo*.

 Sous encore un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de préparation *in vitro* de cellules présentatrices d'antigènes, notamment de cellules
10 dendritiques, chargées en vésicules membranaires, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) l'incubation *in vitro* de cellules présentatrices d'antigènes en présence de vésicules membranaires selon l'invention (étape de sensibilisation des CPA) ; et
- b) la récupération desdites cellules présentatrices d'antigènes chargées en vésicules
15 membranaires ainsi obtenues.

 L'étape a) du procédé de préparation *in vitro* de cellules présentatrices d'antigènes, chargées en vésicules membranaires, nécessite en général une étape préalable de préparation des CPA, notamment de cellules dendritiques.

 Cette étape préalable comprend, lorsqu'il s'agit de cellules dendritiques, la mise
20 à disposition d'une (de) culture(s) de cellules dendritiques. Il peut s'agir de cultures de cellules enrichies en cellules dendritiques, voire de cultures cellulaires comprenant essentiellement des cellules dendritiques. Avantageusement, il s'agit de cellules dendritiques humaines. Par cellules dendritiques, on entendra également inclure ici les cellules dendritiques de type plasmacytoïdes (présentant le phénotype CD11c-/ CD4+).

25 La préparation de cellules dendritiques a été bien documentée dans la littérature. Ainsi, il est connu que ces cellules peuvent être obtenues à partir de cellules souches du système immunitaire ou à partir de précurseurs monocytes, ou encore isolées directement sous forme différenciée (Revue par Hart, Blood, 90, 3245, 1997).

 L'obtention de cellules dendritiques à partir de cellules souches est illustrée par
30 exemple par Inaba et al. (J. Exp. Med., 176, 1693, 1992), Caux et al. (Nature 360, 258, 1992) ou Bernhard et al. (Cancer Res., 55, 1099, 1995).

L'obtention de cellules dendritiques à partir de précurseurs monocytes est illustrée par exemple par Romani et al. (J. Exp. Med. 180, 83, 1994), Sallusto et al. (J. Exp. Med. 179, 1109, 1994), Inaba et al. (J. Exp. Med. 175, 1157, 1992) ou encore Jansen et al. (J. Exp. Med. 170, 577, 1989). Ces méthodologies reposent essentiellement
5 sur le prélèvement de cellules mononucléées dans le sang (PBL) et la mise en culture en présence de différentes combinaisons de cytokines. Une méthode particulière consiste à traiter les précurseurs monocytes du sang en présence de combinaisons de cytokines telles que l'IL-4 avec GM-CSF, ou encore l'IL-13 avec GM-CSF par exemple. Cette technique est également illustrée par Mayordomo et al., 1995.

10 Une autre approche pour l'obtention de cellules dendritiques consiste à isoler, à partir d'échantillons biologiques, des cellules dendritiques plasmacytoïdes déjà différenciées appelées ppDC (pour « plasmacytoid precursor dendritic cells »). Cette approche a été décrite par exemple par Hsu et al. (Nature Medecine 2, 52, 1996). La méthodologie décrite par cette équipe consiste essentiellement à récolter des
15 échantillons de sang périphérique et à les traiter par différents gradients et centrifugations de manière à en extraire les cellules dendritiques.

La méthodologie privilégiée dans le cadre de la présente invention repose sur la production de cellules dendritiques à partir de précurseurs monocytes ou de moelle osseuse. Ces méthodologies sont illustrées dans les exemples ci-après ou dans le
20 document WO 99/03499. Plus particulièrement, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention des cellules dendritiques obtenues par traitement de précurseurs monocytes (contenus dans le sang périphérique ou la moelle) en présence d'une combinaison GM-CSF+IL-4 ou GM-CSF+IL-13.

Par ailleurs, pour la mise en oeuvre du procédé de la présente invention, il est
25 tout particulièrement avantageux d'utiliser une population de cellules dendritiques comprenant des cellules dendritiques immatures. Avantageusement, on utilise une population de cellules dendritiques composée principalement (i. e., au moins 60 %, de préférence 70 %) de cellules dendritiques immatures. L'état immature des cellules dendritiques correspond à un stade précoce de leur développement, auquel elles
30 présentent une forte activité endocytaire et expriment des niveaux faibles de molécules de classe I et II du CMH et de molécules de co-stimulation lymphocytaire à leur surface.

Ainsi, l'étape préalable du procédé de l'invention peut donc comprendre avantageusement la préparation d'une population de cellules dendritiques comprenant des cellules dendritiques immatures, notamment à partir de précurseurs monocytes, plus particulièrement par traitement avec une combinaison de cytokines telle que GM-CSF+IL-4 ou GM-CSF+IL-13.

Par ailleurs, il est également possible d'utiliser dans le cadre de la présente invention des populations de cellules dendritiques immortalisées. Il peut s'agir de lignées de cellules dendritiques immortalisées. Il peut également s'agir de cellules dendritiques préparées puis immortalisées *in vitro*. L'intérêt de cellules dendritiques immortalisées réside dans la constitution de banques de cellules sensibilisées à des groupes d'antigènes donnés, utilisables industriellement et susceptibles d'être administrés (ou leurs dexosomes) à des familles entières de patients.

Lorsque les cellules dendritiques sont préparées, elles peuvent être maintenues en culture, purifiées davantage, stockées ou utilisées directement dans les étapes suivantes du procédé.

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré, les cellules présentatrices d'antigènes à l'étape a) du procédé de préparation *in vitro* de cellules présentatrices d'antigènes, chargées en vésicules membranaires, selon l'invention, sont des cellules dendritiques, notamment immatures, des cellules dendritiques obtenues à partir de précurseurs monocytes ou de moelle osseuse, ou encore des cellules dendritiques issues de cellules dendritiques immortalisées.

Selon un mode de réalisation également préféré, lesdites vésicules membranaires et les cellules présentatrices d'antigènes à l'étape a) du procédé sont autologues ou syngéniques.

Selon un mode de réalisation également préféré, lesdites vésicules membranaires et les cellules présentatrices d'antigènes à l'étape a) du procédé sont allogéniques.

L'étape a) du procédé de préparation *in vitro* de cellules présentatrices d'antigènes, chargées en vésicules membranaires, et consistant à incuber *in vitro* les CPA en présence de vésicules membranaires selon l'invention correspond à l'étape de sensibilisation (ou encore stimulation) des CPA.

L'incubation des CPA, notamment des cellules dendritiques, avec les vésicules membranaires selon la présente invention et contenant des antigènes ou peptides

antigéniques (notamment les texosomes de cellules tumorales selon la présente invention) est particulièrement avantageuse dans la mesure où elle ne nécessite pas la connaissance des antigènes particuliers et où les peptides antigéniques chargés sont dans une conformation native.

5 Pour les conditions de mise en œuvre de cette étape d'incubation, on pourra se référer aux exemples ci-après ou aux exemples décrits dans le document WO 99/03499 pour l'étape d'incubation de cellules dendritiques en présence de texosomes obtenus à partir de cultures de lignées cellulaires tumorales. En général, la mise en contact est réalisée pendant une durée de 30 mn à 5 h, de préférence 1 h 30 mn à 2 h 30 mn.

10 Après l'étape a) de sensibilisation, les CPA ainsi sensibilisées, notamment les cellules dendritiques, sont en général lavées en milieu sans sérum (NaCl 0,9 %) par centrifugation.

Sous encore un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de préparation *in vitro* de vésicules membranaires sécrétées par des cellules présentatrices
15 d'antigènes (dénommées ici « dexosomes ») chargées en vésicules membranaires, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) l'incubation *in vitro* de cellules présentatrices d'antigènes en présence de vésicules membranaires selon l'invention ;
- b) une étape de centrifugation différentielle de fractions membranaires de surnageants
20 de culture des susdites cellules présentatrices d'antigènes chargées en vésicules membranaires selon l'invention ; et
- c) la récupération de la fraction contenant lesdits dexosomes isolés.

Il a en effet déjà été démontré (cf. le document WO 99/03499) que les CPA, notamment les cellules dendritiques, produisent des vésicules membranaires et que ces
25 vésicules constituent des vésicules immunogènes puissantes pour l'immunisation antitumorale. Ces vésicules sont particulièrement avantageuses puisqu'elles permettent d'éviter l'étape d'injection *in vivo* des cellules dendritiques entières dont elles proviennent.

30 Préparation *in vitro* de vésicules membranaires sécrétées par des cellules présentatrices d'antigènes (dénommées ici « dexosomes ») chargées en vésicules membranaires selon l'invention.

Lorsque les populations de cellules dendritiques sont sensibilisées, lesdits dexosomes peuvent être isolés suivant les procédés décrits par exemple dans le document WO 99/03499 pour la préparation de dexosomes isolés de cellules dendritiques préalablement sensibilisés.

5 Brièvement, cette préparation comporte une première étape, facultative, de traitement des cellules CPA, suivie d'une seconde étape d'isolement des dexosomes.

La première étape de traitement des cellules CPA résulte du fait que la production de dexosomes par les CPA, notamment les cellules dendritiques, est un phénomène régulé. Ainsi, en l'absence de traitement, les quantités de dexosomes
10 produites sont relativement faibles, en particulier, lorsque l'on utilise une population de cellules dendritiques matures non préalablement stimulées. Ce traitement stimulant peut être réalisé soit par culture des cellules en présence de certaines cytokines, soit par irradiation des cellules, soit en diminuant le pH de la culture, soit en combinant ces différents types de traitement.

15 Par exemple dans le premier mode de mise en oeuvre, les cellules dendritiques sont incubées en présence d'une cytokine choisie de préférence parmi l'interféron gamma (IFN γ), l'interleukine-10 (IL-10) et l'interleukine-12 (IL-12), de préférence l'interféron gamma et l'IL-10. Dans ce mode de mise en oeuvre, les cytokines sont utilisées à des doses adaptables par l'homme du métier en fonction (i) de la cytokine, (ii)
20 de la population cellulaire et (iii) de la réalisation éventuelle d'autres traitements. Il est entendu que les cytokines sont préférentiellement utilisées à des doses sub-toxiques. Les doses d'interleukine sont généralement comprises entre 1 et 100 ng/ml, de préférence entre 1 et 50 ng/ml. L'interféron peut être mis en oeuvre à des doses comprises entre 1 et 1 000 UI/ml, de préférence entre 100 et 1 000 UI/ml.

25 Dans le second mode de mise en oeuvre, les cellules dendritiques sont soumises à une irradiation. L'irradiation est généralement effectuée entre 1 000 et 5 000 rads, de préférence entre 2 000 et 4 000 rads, avantageusement autour de 3 000 rads.

La seconde étape comprend l'isolement des dexosomes. Cette étape a pour but de séparer les dexosomes des cellules dendritiques et/ou du milieu de culture. Cette étape
30 permet en particulier d'obtenir une composition enrichie en dexosomes et essentiellement dépourvue de cellules intactes. L'isolement des dexosomes à cette seconde étape peut être réalisé en suivant les méthodes appliquées à l'isolement des

vésicules membranaires telles que décrites précédemment (centrifugation différentielle en gradient, électrophorèse fluidique, nanofiltration et/ou immunocapture).

Les dexosomes possèdent en effet des propriétés immunogènes remarquables puisqu'ils sont capables de stimuler la prolifération et l'activité de lymphocytes T cytotoxiques, à la fois *in vitro* et *in vivo*, et qu'ils permettent de supprimer *in vivo* la croissance de tumeurs établies, d'une manière dépendante des lymphocytes T et restreinte au type de MHC (cf. document WO 99/03499). Les dexosomes constituent donc des principes actifs particulièrement adaptés pour des approches non cellulaires d'immunothérapie.

Préférentiellement, le procédé de préparation de dexosomes selon la présente invention conduit à une composition comprenant 70 % au moins de dexosomes, de préférence 85 % au moins.

La présente invention comprend également les cellules présentatrices d'antigènes chargées en vésicules membranaires susceptibles d'être obtenues par le procédé de préparation *in vitro* de cellules présentatrices d'antigènes selon l'invention.

La présente invention concerne en outre les dexosomes isolés, obtenus par le procédé de préparation *in vitro* de vésicules membranaires sécrétées par des cellules présentatrices d'antigènes chargées en vésicules membranaires selon l'invention.

Sous encore un autre aspect, la présente invention comprend un procédé de préparation *in vitro* de lymphocytes T, cellules NK ou NKT activés (stimulés) caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) l'incubation *in vitro* de lymphocytes T, cellules NK ou NKT en présence de cellules présentatrices d'antigènes chargées en vésicules membranaires selon l'invention ou de dexosomes isolés, sécrétés par des cellules présentatrices d'antigènes chargées en vésicules membranaires selon l'invention ; et
- b) la récupération desdits lymphocytes T, cellules NK ou NKT ainsi activés.

Dans un mode de réalisation particulier, la présente invention comprend un procédé de préparation *in vitro* de lymphocytes T anergiques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) l'incubation *in vitro* de lymphocytes T en présence de cellules présentatrices d'antigènes chargées en vésicules membranaires selon l'invention ou de dexosomes

isolés, sécrétés par des cellules présentatrices d'antigènes chargées en vésicules membranaires selon l'invention ; et

b) la récupération desdits lymphocytes T ainsi anergisés.

Par anergie, on entend désigner la défaillance de la réponse T qui peut être également observée lorsque les cellules T sont mises en présence de l'antigène présenté par les CPA

Selon un mode de réalisation préféré du procédé de préparation *in vitro* de lymphocytes T, cellules NK ou NKT selon l'invention ci-avant décrit, les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T sont autologues ou syngéniques.

La présente invention comprend en outre les lymphocytes T, cellules NK ou NKT susceptibles d'être obtenus par le procédé de préparation *in vitro* de lymphocytes T, cellules NK ou NKT selon l'invention ci-avant décrit.

Sous un autre aspect, la présente invention comprend l'utilisation de vésicules membranaires, notamment de texosomes, selon l'invention, de cellules présentatrices d'antigènes ou de dexosomes sécrétés par des cellules présentatrices d'antigènes selon l'invention, ou de lymphocytes T selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée chez un patient et à induire ou à augmenter une réponse immune de type CTL spécifique d'antigènes contenus dans lesdites vésicules membranaires selon l'invention, et dans laquelle utilisation, lesdites vésicules membranaires, cellules présentatrices d'antigènes et lymphocytes T sont autologues ou syngéniques du patient à traiter.

Sous un autre aspect, la présente invention comprend l'utilisation de vésicules membranaires, notamment de texosomes, selon l'invention, de cellules présentatrices d'antigènes ou de dexosomes sécrétés par des cellules présentatrices d'antigènes selon l'invention, ou de cellules NK ou NKT selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée chez un patient et à induire ou à augmenter une réponse innée de type NK ou NKT spécifique d'antigènes contenus dans lesdites vésicules membranaires selon l'invention, et dans laquelle utilisation, lesdites vésicules membranaires, cellules présentatrices d'antigènes et cellules NK ou NKT sont autologues ou syngéniques du patient à traiter.

De préférence, ladite composition pharmaceutique est destinée à la prévention ou au traitement de patients atteints d'un cancer.

Sous un autre aspect, la présente invention comprend l'utilisation de cellules présentatrices d'antigènes, notamment de cellules dendritiques, prélevées chez un premier patient (le receveur) ou chez un patient dont ses cellules présentatrices d'antigènes sont syngéniques (ayant des haplotypes d'HLA communs) aux cellules
5 présentatrices d'antigènes du premier patient, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée chez ce premier patient, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes ont été préalablement chargées *in vitro* avec des vésicules membranaires selon l'invention isolées à partir d'un fluide biologique, notamment ascitique, de préférence tumoral, prélevé chez un deuxième
10 patient (le donneur), ledit receveur et donneur étant allogéniques.

Sous un autre aspect, la présente invention comprend l'utilisation de lymphocytes T prélevées chez un premier patient (le receveur) ou chez un patient dont ses lymphocytes T sont syngéniques aux lymphocytes T du premier patient pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée chez ce
15 premier patient, caractérisée en ce que lesdits lymphocytes T ont été préalablement activés *in vivo* avec des cellules présentatrices d'antigènes préalablement chargées avec des vésicules membranaires selon l'invention, lesdites vésicules membranaires ayant été isolées à partir d'un fluide biologique prélevé chez un deuxième patient (le donneur), ledit receveur et donneur étant allogéniques.

20 La présente invention concerne en outre l'utilisation de cellules présentatrices d'antigènes, ou leurs dexosomes, ou de lymphocytes T selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à induire la tolérance par ledit receveur d'un greffon allogénique prélevé chez ledit donneur.

La présente invention concerne en outre l'utilisation de cellules présentatrices
25 d'antigènes, ou leurs dexosomes, ou de lymphocytes T selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à induire la tolérance par ledit receveur d'un greffon allogénique prélevé chez ledit donneur par la méthode dite de « transfert adoptif de cellules dendritiques du receveur préalablement chargées *in vitro* par des vésicules membranaires du donneur » ou par la méthode dite de « transfert
30 adoptif de lymphocytes T du receveur préalablement activés *in vivo* par des CD du receveur préalablement chargées (pulsées) par des vésicules membranaires du donneur ».

Sous encore un autre aspect, la présente invention comprend l'utilisation de vésicules membranaires, de cellules présentatrices d'antigènes ou de dexosomes selon l'invention, pour la sélection *ex vivo* d'un répertoire de lymphocytes T et/ou de cellules NK ou NKT, susceptibles de reconnaître des antigènes spécifiques, glycolipides ou phospholipides contenus dans lesdites vésicules membranaires selon l'invention.

L'invention comprend aussi un médicament comprenant à titre de substance active une ou plusieurs vésicules membranaires, cellules présentatrices d'antigènes ou dexosomes, ou encore des lymphocytes T, de cellules NK ou NKT selon la présente invention, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, notamment pour le traitement des cancers.

Comme forme galénique appropriée, les vésicules membranaires, cellules présentatrices d'antigènes ou dexosomes, ou encore des lymphocytes T selon la présente invention peuvent être contenus dans du sérum physiologique, dans une ampoule ou tout autre moyen approprié (seringue, poche, etc.). Ils peuvent être préparés extemporanément ou stockés, par exemple sous forme congelée à -80°C . Les solutions utilisées peuvent être composées de solutions salines, éventuellement supplémentées d'agents stabilisants et/ou d'adjuvants. Les agents stabilisants peuvent être notamment des protéines ou des molécules de haut poids moléculaire. On peut citer plus particulièrement des protéines telles que la sérum-albumine humaine, ou des molécules telles que le dextran ou le poloxamer par exemple.

Un mode d'administration approprié des médicaments ou compositions pharmaceutiques selon l'invention est constitué par des injections, et notamment des injections intradermiques ou sous-cutanées. Ce mode d'administration est particulièrement adapté lorsque la substance active du médicament est constituée par des CPA, notamment des cellules dendritiques, chargées en vésicules membranaires selon l'invention (notamment en texosomes) ou par des dexosomes selon l'invention.

Les posologies appropriées sont de 0,01 à 10 $\mu\text{g/kg}$, et notamment 0,10 à 5 $\mu\text{g/kg}$, encore plus particulièrement de 0,15 à 2 $\mu\text{g/kg}$ de poids corporel, et de 10 pg pour les vaccinations et 100 fois moins pour les tests de réaction intradermiques (HSR).

De manière préférée, ledit médicament selon la présente invention comprendra en outre un adjuvant immunostimulant synthétique ou naturel.

Les compositions de l'invention peuvent également comprendre ou être utilisées en association avec un ou plusieurs adjuvants. L'adjuvant peut être plus particulièrement tout agent pharmacologique immunostimulant, tel que par exemple une cytokine (notamment l'interleukine-12). De tels agents sont classiquement utilisés dans les protocoles cliniques ou dans des compositions de vaccins. Par ailleurs, l'adjuvant selon l'invention peut également être un agent capable de stimuler la production de cellules dendritiques *in vivo*. On peut citer à titre d'exemple le composé Flt3L $\pm$ 4-IBBL. L'utilisation combinée de ce type d'agent permet d'augmenter le nombre de cellules dendritiques, et donc d'améliorer potentiellement l'efficacité des compositions de l'invention.

Un autre objet de l'invention concerne aussi une association de vésicules membranaires et/ou cellules présentatrices d'antigènes (ou leurs dexosomes) et d'un adjuvant, en vue d'une utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

L'invention concerne également la création de banques de texosomes selon l'invention dérivés de cellules tumorales de type histologique commun ou différent.

Celles-ci pourront être composées de mélanges de texosomes faits à partir de prélèvement *in vivo* chez des patients atteints d'un type de cancer donné. Ces banques de texosomes peuvent permettre de sensibiliser des cellules présentatrices d'antigènes, notamment des cellules dendritiques, contre toutes les tumeurs de ce type.

L'invention concerne également des mélanges de texosomes ou dexosomes selon la présente invention, notamment à titre de médicament.

On peut citer par exemple des mélanges de texosomes selon l'invention pour des tumeurs génétiquement reliées (cancer du sein et de l'ovaire) ou présentant des mutations p53, p16 connues (cancer du sein, mélanomes, glioblastes, sarcomes).

On peut également mentionner des mélanges de texosomes selon l'invention avec des vésicules membranaires provenant de cellules immortalisées et transfectées pour exprimer des molécules de co-stimulation, des molécules d'adhésion, des chemokines attractantes (différentes de celles exprimées sur les texosomes).

Sous un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation de texosomes, ou de CPA, notamment de cellules dendritiques selon l'invention, pour la fabrication d'un test d'hypersensibilité retardé du cancer, ou comme outil de diagnostic de

recherche de fréquence de précurseurs spécifiques CTL, NK ou NKT (immunomonitoring).

Il s'agit ici d'utiliser les CPA, notamment les cellules dendritiques, autologues ou allogéniques préincubées avec les texosomes de l'invention, comme cibles de lymphocytes périphériques de sujets porteurs de la tumeur, avant, pendant et après traitement anti-tumoral (traitement classique ou immunisation active spécifique).

Sous un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de diagnostic *in vitro* d'un cancer et/ou de son évolution chez un patient, caractérisé en ce qu'on détermine la présence de marqueurs spécifiques d'un cancer et/ou de son évolution à la surface et/ou dans le cytosol de vésicules membranaires obtenues à partir de fluide biologique prélevé *in vivo* chez ledit patient.

De manière préférée, ledit fluide biologique est un fluide d'ascite ou une effusion, notamment émanant d'une cavité, telle qu'une cavité péritonéale, abdominale ou pleurale.

De manière préférée, la détermination de la présence de marqueurs d'un cancer et/ou de son évolution est réalisée par une technique immunoenzymatique de type immunocapture, par Western Blot ou ELISA à l'aide d'anticorps spécifiques de ces marqueurs.

Les vésicules membranaires selon la présente invention, notamment celles dérivées de fluide d'ascite, peuvent ainsi non seulement être utilisées comme une source d'antigènes tumoraux naturels conduisant à de nouvelles voies thérapeutiques (comme ci-avant citées et également comme source d'antigènes pour l'immunisation prophylactique active après le second « look » dans le cancer des ovaires Figo IIIc ou de mésothélium, transfert passif dans la cavité péritonéale de lymphocytes T primés activés *in situ* comme une thérapie adjuvante contre la maladie résiduelle (cf exemples 5 et suivants)) mais également comme une nouvelle entité de la physiopathologie humaine qui peut être utilisée pour contrôler le statut de la tumeur (diagnostic et pronostic, chimiorésistance et détoxification). L'ensemble de ces utilisations sont bien entendu comprises dans la présente invention.

Sous un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de préparation *in vivo* d'une banque de texosomes dérivés de fluide d'ascite péritonéal, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape suivante :

a) l'implantation par voie intrapéritonéale d'une tumeur, tissu ou cellules tumorales humaines dans une souris SCID, notamment SCID/NOD ;

Sous un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de préparation *in vitro* d'une banque d'anticorps d'origine murine dirigés contre des antigènes humains, notamment tumoraux, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivante :

- a) l'implantation par voie intrapéritonéale d'une tumeur, tissu ou cellules tumorales humaines dans une souris SCID, notamment SCID/NOD ;
- b) le prélèvement *in vivo* chez la souris SCID d'un échantillon de fluide d'ascite péritonéal résultant de l'implantation et contenant ladite banque d'anticorps ; et
- 10 c) le cas échéant, la purification des anticorps contenus dans ledit prélèvement.

Dans un mode de réalisation particulier, les lymphocytes sécrétant de tels anticorps contenus dans l'échantillon de fluide d'ascite péritonéal prélevé *in vivo* chez la souris SCID à l'étape b) pourront être utilisés pour obtenir des lignées cellulaires ou hybridomes par fusion avec par exemple une cellule tumorale selon la technique bien connue de Kohler et Milstein pour la production d'anticorps monoclonaux.

Sous un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de préparation *in vitro* d'une banque de texosomes isolés d'origine murine et humaine, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivante :

- a) l'implantation par voie intrapéritonéale d'une tumeur, d'un tissu ou de cellules tumorales humaines dans une souris SCID;
- b) le prélèvement *in vivo* chez la souris SCID d'un échantillon de fluide d'ascite péritonéal résultant de l'implantation; et
- c) l'isolement *in vitro* desdits texosomes à partir dudit échantillon prélevé par centrifugation, électrophorèse, chromatographie, nanofiltration et/ou par
- 25 immunocapture.

Sous un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de préparation de texosomes modifiés *in vitro*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) l'isolement *in vitro* de vésicules membranaires (texosomes) à partir d'un échantillon de fluide d'ascite tumoral par un procédé de préparation *in vitro* de vésicules membranaires isolées de leur environnement naturel selon l'invention;
- b) l'élution, notamment acide, desdits texosomes naturels obtenus à l'étape a) ;
- 30

c) la mise en contact desdits texosomes naturel élués avec des peptides, notamment synthétiques, glycolipides ou phospholipides d'intérêt, de préférence exogène que l'on désire charger dans les texosomes ; et

d) la récupération desdits texosomes ainsi modifiés.

5 Sous un dernier aspect, la présente invention concerne l'utilisation de texosomes :

- isolés de leur environnement naturel à partir d'un échantillon de fluide d'ascite tumoral par un procédé de préparation *in vitro* de vésicules membranaires selon l'invention ; ou

10 - obtenus par un procédé de préparation de texosomes isolés *in vitro* dérivés de fluide d'ascite péritonéal après implantation d'une tumeur, tissu ou cellules tumorales humaines dans une souris SCID selon l'invention ; ou encore

- obtenus par un procédé de préparation de texosomes modifiés *in vitro* selon l'invention,

15 pour la préparation d'anticorps ou de banques d'anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux contenus dans ou portés par lesdits texosomes.

La présente invention sera décrite plus en détails à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

20

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Les carcinomes péritonéaux sécrètent des vésicules de 50 à 100 nm dans les ascites.

25 La figure 1 représente des vésicules purifiées à partir d'ascite d'un patient porteur de mélanome avec extension péritonéale vues en microscopie électronique.

Figures 2A à 2D : Les vésicules d'ascite contiennent des molécules de classe I, des protéines du choc thermique 80 et des antigènes tumoraux.

30 Les figures 2A à 2C présentent des immunoempreintes réalisées sur des échantillons de vésicules d'ascite (5 à 20 µl/puits). La figure 2A montre la présence de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et de protéines du choc thermique (HSP80) dans des vésicules de patients porteurs de cancer de l'ovaire ou de mélanome. La figure 2B montre l'absence de protéine gp96 dans les vésicules d'ascite, à

la différence du lysat cellulaire. La figure 2C montre la présence de la protéine Mart1 dans les vésicules d'ascite de mélanome.

La figure 2D montre la présence des deux isoformes de lactadhérine dimérisées dans les vésicules d'ascite.

5 Figures 3A et 3B : Les vésicules d'ascite véhiculent une présentation croisée d'antigène de tumeur Mart1.

La figure 3A présente le mode expérimental. Des vésicules d'ascite (10 à 20 μ l) de patient HLA-A2- porteur d'un mélanome avec extension péritonéale étaient chargées sur 10^4 cellules dendritiques A2+. Ces cellules dendritiques étaient cocultivées pendant
10 24 h avec 10^4 cellules d'un clone T CD8+ spécifique de Mart1 et restreint pour l'haplotype A2 (LT11). L'activation du clone était évaluée sur la sécrétion d'interféron- γ .

La figure 3B montre les taux d'interféron- γ sécrétés par les clones LT11 après
15 24 h de coculture avec les cellules dendritiques non chargées, chargées avec des vésicules de patients porteurs de carcinome ovarien ou de mélanome. Le contrôle positif était représenté par les cellules dendritiques chargées avec des exosomes issus d'une lignée cellulaire de mélanome Mart1+, HLA-A2- (Mel 888). Les taux sont la moyenne de triplicate.

Figure 4 : Mode expérimental des stimulations *in vitro* des lymphocytes.

20 Le mode expérimental des stimulations *in vitro* est représenté sur la figure 4. Les monocytes et les lymphocytes étaient prélevés dans le sang périphérique, les vésicules et les cellules tumorales étaient isolées à partir de l'ascite. Les cellules dendritiques étaient dérivées des monocytes en GM-CSF et IL-4. Les lymphocytes circulants étaient stimulés 3 fois (J0, J7, J14) avec des cellules dendritiques chargées ou non avec 10 ou
25 20 μ l de vésicules d'ascite. Les cocultures étaient réalisées en plaques de 96 puits à fond rond. La spécificité des lymphocytes était évaluée sur leur capacité à lyser la tumeur autologue et à sécréter de l'interféron- γ en présence de cellules tumorales.

Figures 5A et 5B : Les lymphocytes induits par les vésicules d'ascite reconnaissent spécifiquement les cellules tumorales via une interaction médiée par les molécules du
30 CMH I.

La figure 5A représente la lyse des cellules tumorales et des cellules K562 par les lymphocytes du patient 1 après 3 stimulations par des cellules dendritiques chargées

avec des vésicules d'ascite. La lyse contre les cellules tumorales autologues était évaluée en présence de cellules K562 froides. Les valeurs représentent la moyenne de trois puits.

La figure 5B représente l'inhibition de la lyse des cellules tumorales par un anticorps anti-classe I (w632). Les lymphocytes stimulés trois fois par des cellules dendritiques chargées avec 10/20 µl de vésicules étaient cocultivés en présence de cellules tumorales marquées par du chrome 51, en présence de K562 froides. Les cellules tumorales étaient préincubées avec 100 µl d'anticorps w632 pendant 1 h.

Figure 6 : L'injection de vésicules d'ascite augmente la survie des souris DBA2 porteuses de leucémie L1210.

Les vésicules L1210 étaient purifiées à partir d'ascite de souris porteuses de leucémie L1210 avec extension péritonéale. Ces vésicules étaient injectées en sous-cutané à des souris porteuses de leucémie L1210. Les survies étaient évaluées à J12 et J24.

██████████ (en gris) Injection de Tex de liquide péritonéal non tumoral (souris pristanisées).

————— (en noir) Injection d'exosomes purifiés à partir d'ascites de L1210.

Figures 7A à 7C : Panel A : Phénotype des lymphocytes après 3 stimulations

Figure 7A : lymphocytes stimulés en présence de CD chargées par des exosomes d'ascites (DC/ExAs).

Figure 7B : lymphocytes stimulés en présence de CD chargées par des cellules tumorales irradiées autologues.

Figure 7C : Test fonctionnel de lymphocytes stimulés 3 fois.

Figures 8A à 8C : Les lymphocytes stimulés reconnaissent les cellules tumorales via une interaction médiée par les molécules du MCH I : Exemple 2.

Les figures 8A et B montrent les phénotypes des lymphocytes après 3 stimulations avec des CD chargées (panel A) ou non (panel B) avec des vésicules d'ascite. La figure 8C représente un test de sécrétion d'interféron-γ par les lymphocytes en présence de cellules tumorales autologues. Deux conditions de lymphocytes étaient testées. La première condition était les lymphocytes du patient 3 stimulés trois fois avec des cellules dendritiques non chargées. La deuxième condition était les lymphocytes du

patient 3 stimulés par les cellules dendritiques chargées avec des vésicules d'ascite. 10^4 lymphocytes étaient cocultivés avec 10^4 cellules tumorales préincubées ou non 1 h avec de l'anticorps w632 (100 μ l/ puits). Les valeurs représentent la moyenne de trois puits. Les écarts types sont représentés sous forme de barres.

5

EXEMPLES

Les exemples 1 à 4 concernent la mise en évidence de vésicules membranaires dans des liquides d'ascite de patients porteurs de carcinomes péritonéaux et l'utilisation de ces vésicules pour la présentation croisée d'antigènes.

10 Exemple 1: Matériel et méthodes

A) Cultures cellulaires

Les cellules dendritiques sont obtenues à partir de monocytes différenciés en GM-CSF (1 000 UI/ml) et IL-4 (1 000 UI/ml, Shering Plough). Elles sont utilisées à J7 pour les stimulations *in vitro* et les tests de présentation croisée.

15 Les cellules tumorales utilisées pour les tests de cytotoxicité sont obtenues par centrifugation de l'ascite et cultivées en milieu RPMI1640, 10 % sérum de veau foetal, 50 UI/ml de pénicilline, 50 μ g/ml de streptomycine, 2 mM L-glutamine, 1 mM Na pyruvate.

B) Obtention de l'ascite et purification des vésicules d'ascite

20 L'ascite est prélevé sur des patients porteurs de carcinomes péritonéaux diagnostiqués sur la présence de cellules tumorales dans le culot de centrifugation et une teneur en protéines supérieure à 30 g/l.

Les premières étapes consistent à récupérer le surnageant des centrifugations faites à 1 200 trs/min (10 min), 3 000 trs/min (15') à deux reprises, 10 000 trs/min (30').

25 Les vésicules sont récupérées après une ultracentrifugation à 29 000 trs/min pendant 1 h. Les vésicules sont isolées sur un coussin de D20 + sucrose à une densité de 1,077 au cours d'une ultracentrifugation de 23 500 trs/min (durée : 1 h 15). Les vésicules sont alors récupérées dans le coussin et concentrées grâce à une ultracentrifugation à 49 000 trs/min pendant 1 h.

30 L'ensemble de ce procédé permet d'obtenir ce qui sera appelé par la suite les vésicules d'ascite (ou texosomes selon l'invention).

C) Microscopie électronique

Les vésicules sont fixées en 4 % paraformaldéhyde. Les vésicules sont étalées sur des grilles de microscopie et visualisées (cf figure 1) (cf également l'exemple 5C).

D) Western blot

Les vésicules sont réduites en DMSO 5 % et chauffées à 96°C pendant 10 mn.

5 Une migration est faite sur gel Novex. Les protéines migrées sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les protéines sont alors hybridées avec un anticorps anti-MHC classe I (HC10, Soldano Ferrone, NY, USA), anti HSC-80 (SPA 815, Stressgen), anti-gp96 (SPA850, Stressgen, anti Mart1 (clone A103, Novocastra) ou anti-lactadhérine (cf exemple 2D). La révélation est faite à l'aide d'un anticorps couplé à la
10 peroxydase (cf figures 2A à 2D).

E) Tests de présentation croisée *in vitro*

Les vésicules sont purifiées à partir d'ascite d'un patient HLA-A2- porteur d'une carcinose péritonéale de mélanome. Les vésicules sont incubées avec 10 000 cellules dendritiques HLA-A2+ (30 µl) pendant 2 h. Après 2 h, 10 000 LT11 (clone restreint par
15 HLA-A2 et spécifique de Mart1) sont cocultivées avec les cellules dendritiques pendant 24 h. Le surnageant est prélevé et un dosage ELISA d'interféron-γ est alors réalisé afin d'évaluer l'activation du clone (cf figures 3A et 3B)).

F) Tests de stimulation *in vitro*

Les vésicules (20 µl d'un liquide d'ascite concentré 2 000 fois)) sont chargées
20 sur les cellules dendritiques autologues (30 000 / puits) dans 30 µl de milieu (RPMI1640, 10 % sérum humain AB', 50 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, 2 mM L-glutamine, 1 mM Na pyruvate). Après 2 h d'incubation, les cellules dendritiques sont cocultivées avec des lymphocytes circulants autologues dans des plaques de cultures de 96 puits fond rond. Les lymphocytes sont cultivés à 100 000
25 par puits. Les cultures sont faites en présence d'interleukine 2 (proleukine, Chiron) à 50 UI/ml et de facteurs de stimulation T. Les lymphocytes sont stimulés par les cellules dendritiques à trois reprises à J0, J7, J15 et sont testés pour leur aptitude à lyser les cellules tumorales autologues (cf tableau 1, également pour figure 5A).

Les contrôles négatifs des stimulations comprennent les cellules tumorales
30 irradiées (30 000 cellules / puits) ou les cellules dendritiques autologues non chargées. Pour les cytotoxicités, les cellules tumorales autologues ou les cellules K562 sont chromées pendant 1 h avec du ⁵¹Cr. Les cellules sont lavées à trois reprises et 2 000

cellules sont platées dans des puits à fond conique. Les cellules tumorales sont incubées avec 50 000 ou 100 000 cellules K562 non chromées. La lyse est le résultat de l'équation suivante : (nombre de coups-min) / (MAX-min) ou min est le nombre de coups relargués dans les surnageants de cellules tumorales autologues et MAX est le nombre de coups des cellules tumorales incubées avec du cétrimide (cf tableau 1, également pour figure 5A)..

Exemple 2 : Mise en évidence de vésicules membranaires contenant des antigènes de tumeur dans l'ascite de patients porteurs de carcinose péritonéale

L'étude en microscopie électronique met en évidence que la centrifugation différentielle de l'ascite permet d'obtenir des vésicules membranaires (cf. figure 1). Les études de microscopie mettent également en évidence que ces vésicules mesurent entre 30 et 150 nm et ont une tendance à l'agrégation. L'analyse biochimique des vésicules met en évidence la présence de molécules du CMH I (cf. figure 2A), HSP 70, HSP 80 (cf. figure 2A). et lactadhérine (cf. figure 2D). Chez le patient porteur de mélanome, il a également été mis en évidence la présence d'un antigène de tumeur Mart1 (cf. figure 2C). En revanche, les vésicules d'ascite ne contiennent pas de gp96 (cf. figure 2B) ce qui signifie qu'il n'existe pas de contamination par des débris cellulaires.

Exemple 3 : Les vésicules membranaires de type texosome induisent une présentation croisée d'antigène par les cellules dendritiques

La figure 3B montre que les vésicules purifiées à partir d'ascite de patient HLA-A2- porteur de mélanome MART1+ chargé sur des cellules dendritiques HLA-A2+ activent le clone LT11 (restreint HLA-A2 et spécifique de Mart1). Ceci signifie que les vésicules d'ascite sont captées efficacement par les cellules dendritiques et induisent une présentation croisée d'antigène. Au contraire, les CD-A2+ pulsées par les texosomes (Tex) des ascites de cancer ovarien Mart1-, n'induisent pas de stimulation de LT11.

Exemple 4 : Les vésicules d'ascite chargées sur des cellules dendritiques induisent des lymphocytes T cytotoxiques reconnaissant les épitopes présentés par les cellules tumorales autologues

Afin d'évaluer leur immunogénicité, les vésicules d'ascite d'une patiente porteuse d'un adénocarcinome ovarien ont été chargées sur des cellules dendritiques autologues, et une coculture avec les lymphocytes circulants a été réalisée (cf. figure 4). Le tableau 1 de résultats (cf ci-après) met en évidence d'une part :

- la prolifération importante des lymphocytes obtenue en présence des cellules dendritiques autologues chargées par les vésicules d'ascite d'une patiente porteuse d'un adénocarcinome ovarien comparée à la coculture obtenue en présence de la tumeur autologue ; et d'autre part
- 5 - la lyse de la tumeur autologue par les lymphocytes stimulés par les cellules dendritiques chargées avec les vésicules d'ascites.

En revanche, les lymphocytes stimulés par les cellules tumorales autologues ne sont pas capables de lyser les cellules tumorales. Les lymphocytes induits par les vésicules lysent la cellule tumorale autologue, mais pas significativement K562 (cf. figure 5A). De plus, la lyse peut être bloquée par un anticorps anti-MHC classe I (cf. figure 5B). Ceci signifie que les cellules dendritiques chargées par des vésicules d'ascite ont induit des lymphocytes T cytotoxiques reconnaissant des épitopes présentés par les cellules tumorales autologues. Les vésicules d'ascite peuvent être de ce fait utilisées à des fins thérapeutiques comme vaccin autologue ou allogénique, mais aussi comme

10

15 méthode de chargement des cellules dendritiques à visée thérapeutique.

Tableau 1 : Prolifération (ou amplification) des cellules CD3/CD8+ et pourcentage de lyse contre la tumeur autologue obtenus avec des cellules dendritiques chargées avec les vésicules d'ascite, ou avec les cellules tumorales autologues.

20

	Nombre de cellules CD3/CD8	% lyse contre la tumeur autologue*
PBL J0	0,6x10 ⁵	0 %
PBL J21 CD + Texosome	7x10 ⁵	30 %
PBL J21 Tumeur	0,8x10 ⁵	0 %

Rapport Effecteur / Cible (E:T): 50/1 ; PBL J21 : lymphocytes après trois stimulation *in vitro*. ; *Lyse non spécifique inhibée par les cellules K562 non chromées (K562 froides).

25 La figure 6 met en évidence la survie prolongée de souris DBA2 vaccinées par des texosomes d'ascites selon l'invention contre la leucémie autologue par rapport à un

vaccin de contrôle de type placebo (injection de "Tex" de liquide péritonéal de souris pristanisées).

Les exemples 5 et suivant concernent la mise en évidence de vésicules
5 membranaires dans des liquides d'ascite pleuraux ou péritonéaux de patients porteurs
d'adénocarcinomes (cf tableau 2), leur caractérisation et leurs utilisations.

Exemple 5 : Patients et méthodes

A) Patients

Les patients présentant une carcinomatose péritonéale associée avec une ascitis
10 ont été inclus dans la présente étude. La présence de cellules tumorales dans les ascites
non hémorragiques était un critère de sélection des patients pour cette étude. Les
caractéristiques cliniques des patients sont résumées dans le tableau 2 ci-après. La
plupart étaient des femmes présentant un cancer des ovaires au stade IIIc Figo. Les
ascites sont récupérées soit durant la première intervention («debulking») et
15 observation par les chirurgiens ou dans le cas de l'apparition de symptômes associés
aux ascites. Les patients étaient exclus de l'étude si a) ils reçoivent une chimiothérapie
dans les quatre semaines avant la récupération des ascites ou si b) le taux de protéines
dans les exsudats est inférieur à 30 g/l ou si c) une hémorragie est associée à la
carcinomatose. Les patients ont donné leur consentement éclairé suite à l'approbation
20 par le conseil d'éthique de l'Institut Gustave-Roussy de ce protocole (Comité Consultatif
pour la Protection des Personnes en Recherche Biomédical (CCPPRB)). Un patient
(patient 5) présentant un cancer du poumon associé à une effusion pleurale maligne a
également été inclus.

Tableau 2 : Caractéristiques des patients

Numéro et sexe du patient	Tumeur primitive	Sous-type histologique	Stade de la tumeur	Statut de la maladie	Chimiothérapie antérieure
Pt 1 (F)	Cancer ovarien	Adénocarcinome	IIIc	Rechute	Oui
Pt 2 (M)	Cancer rénal	Adénocarcinome	IV	Rechute	Oui
Pt 3 (F)	Cancer ovarien	Adénocarcinome	IIIc	Diagnostique	Non
Pt 4 (F)	Primitive, non déterminée	Adénocarcinome	ND	Diagnostique	Non
Pt 5 (M)	Cancer du poumon	Adénocarcinome	IV	Rechute	Oui
Pt 6 (F)	Cancer du sein	Adénocarcinome	IV	Diagnostique	Non
Pt 7 (F)	Cancer ovarien	Adénocarcinome	IIIc	Diagnostique	Non

B) Purification d'exosomes (vésicules membranaires ou ici texosomes)

Les ascites sont centrifugées à 1 200 trs/mn pour éliminer les cellules en suspension. Les surnageants sont récupérés et centrifugés successivement à 3 000 trs/mn durant 30 min, 10 000 trs/mn durant 30 min et 29 000 trs/mn durant 1 h. Suite à la
5 dernière étape de centrifugation, le culot est récupéré, resuspendu dans 30 % dans un gradient de 30 % sucrose / D2O et ultracentrifugé à 23 500 trs/mn durant 1 h 15 min pour permettre aux débris cellulaires non désirés d'être culottés puis éliminés. Les exosomes sont contenus dans le coussin de 30 % sucrose / D2O et ceci est vérifié par une analyse en microscopie électronique puis lavé dans du PBS et concentré en utilisant
10 une dernière étape de 1 h de ultracentrifugation à 40 000 rpm. Le culot d'exosomes est resuspendu dans du PBS et stocké de manière stable à -80° . Un procédé similaire est réalisé pour purifier les exosomes du surnageant de la lignée cellulaire autologue.

C) Microscopie électronique

Les exosomes obtenus après les centrifugations différentielles sont fixés dans du
15 paraformaldéhyde 4 % et stockés à 4°C . Les exosomes sont chargés sur des grilles de microscopie électronique « formvar-carbon » et marqués à l'immunogold. Le contraste est obtenu tel que décrit dans Raposo et al. (1996) (cf également Zitvogel et al., 1998 et Wolfers et al., 2001).

D) Analyse par Western blot

20 Les protéines exosomales et de lysats cellulaires sont extraites telles que précédemment décrites puis analysées en Western blotting en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre le HLA humain de classe I (HC10, généreusement offert par Soldano Ferrone, Roswell Park Cancer Institute, NY, USA), un anticorps anti-HSP 70 (SPA 815, Stressgen, Canada), un anticorps anti-gp96 (SPA 850, Stressgen, Canada), et
25 un anticorps anti-MHC de classe II ou un anticorps anti-Mart-1/MelanA (clone A103, Novocastra, Royaume Uni) aux dilutions recommandées par le fabricant suivies par une révélation utilisant des anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort et par une révélation à la chimioluminescence (Boehringer Mannheim, Penzberg, Germany). Des anticorps anti-lactadhérine sont produits par des lapins immunisés avec
30 la lactadhérine humaine.

E) Cultures cellulaires

a) Lignées tumorales primaires autologues et cellules tumorales

Les cellules tumorales sont culottées par une centrifugation à 1 200 trs/mn des ascites puis cultivées dans du RPMI 1640 supplémenté avec 50 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, 2 mM L-glutamine, 1 mM de Na pyruvate (Gibco-BRL, France) et 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté (Seromed, France). Ces cellules sont caractérisées avant la congélation par May-Grunwald-Giemsa et une coloration avec un anticorps anti-cytokératine par les pathologistes sur cytopins. La plupart des tests de relargage de ^{51}Cr sont réalisés en utilisant des cellules tumorales dérivées d'ascites autologues ayant subi trois à cinq passages. Après six passages, les lignées tumorales sont congelées pour un usage ultérieur. La lignée Mel888 est une lignée cellulaire de mélanome établie MART1+ et HLA-A2 négative qui a été généreusement offerte par le Dr. Markus Maeurer, Université de Mainz (Germany).

b) Cellules dendritiques et lymphocytes (MD-DC)

Les CD-MD (cellules dendritiques dérivées de monocytes) sont obtenues à partir de la fraction adhérente de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC), ou à partir d'effusion de tumeur portée par les patients décrits dans le tableau 1 après leur consentement éclairé. Brièvement, les PBMC sont isolés par centrifugation sur un gradient de densité en utilisant du Ficoll-Hypaque puisensemencés à une concentration de 3 à 5×10^6 cellules/ml dans un milieu AIMV (Gibco-BRL, France) supplémenté avec 50 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, 2 mM de L-glutamine, 1 mM de Na pyruvate (Gibco-BRL, France), 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté (Seromed, France). L'ensemble des lymphocytes est déplété par une étape d'adhérence de 3 h à 37°C, suivie par trois étapes de lavage dans un tampon salin. Les cellules adhérentes sont propagées dans un milieu complet AIMV contenant 1 000 IU/ml de GM-CSF recombinant humain et d'IL-4 (Novartis(Schering Plough NJ, Kenilworth, USA). Le "bulk" de lymphocytes et de cellules dendritiques est congelé au jour 0 et au jour 5 respectivement. Les CD-MD sont utilisées au jour 6, un jour après la décongélation, pour des stimulations *in vitro*.

F) Tests *in vitro* de présentation croisée

LT11 (Vβ9) est un clone cellulaire de cellule T CD8+ restreint Mart-1(27-35)-spécifique, HLA-A2+-propagé tel que précédemment décrit (Dufour et al., J. Of Immunology, 158, 8, 3787-95, 1997) Au jour 6, les CD-MD HLA-AA2+ sont ensemencées à une concentration de 2×10^4 cellules/puits pendant 2 h avec des exosomes

purifiés à partir d'ascites de patients de mélanome HLA-A2- ou à partir de surnageants de lignée cellulaire de mélanome Mel888 HLA-A2 négatif. 2×10^4 LT11 sont ajoutés aux 2×10^4 CD-MD dans un volume final de 200 μ l dans des plaques de 96 puits ayant des puits arrondis. Le surnageant de 24 h est testé dans un test ELISA IFN γ (Immunotech, Marseille, France).

G) Stimulations de PBLs in vitro

Des microcultures in vitro mixtes sont réalisées dans des microplaques de 96 puits présentant des puits arrondis dans un milieu RPMI complet supplémenté avec 10 % de sérum humain AB poolé, 100 UI/ml d'IL2 (Proleukine, Chiron), des facteurs de croissance des cellules T (Dufour et al., 1997). 3×10^4 cellules CD autologues sont pulsées avec des exosomes autologues dérivés d'ascites ou des exosomes dérivés de cellules tumorales autologues pendant 2 h dans 50 μ l. La quantité d'exosomes pulsés dans les puits contenant les CD est équivalente à 30 ml d'effusion pleurale / péritonéale ou de surnageant de culture. Les PBL (lymphocytes de sang périphérique) autologues sont ensuite ajoutés à un ratio de trois lymphocytes pour une CD dans un volume final de 200 μ l/puits. Trois stimulations *in vitro* hebdomadaires de PBL sont réalisées. Les conditions de culture alternative et des contrôles négatifs incluent des stimulations avec des cellules tumorales autologues irradiées (10^4 /puits) pour le patient 1, des stimulations avec des cellules CD non pulsées chez les six autres patients. Au jour 21, des lymphocytes stimulés sont récupérés, comptés au bleu trypan et phénotypés par une analyse au Facscan en utilisant des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56 monoclonaux (Coulter, Fullerton, USA) et testés pour le relargage au ^{51}Cr et pour des tests de sécrétion d'IFN γ contre les cellules tumorales autologues avec ou sans un anticorps W6.32 monoclonal ou des cellules tumorales sans rapport.

H) Test de relargage de l'IFN γ

5×10^4 lymphocytes stimulés in vitro de manière hebdomadaire après trois étapes d'incubation avec des cellules autologues CD pulsées ou non avec des exosomes sont incubés avec ou sans 10^4 cellules tumorales autologues. Pour vérifier la restriction du CMH de classe I sur la reconnaissance des tumeurs, l'anticorps W6.32 est incubé 1 h avec les cellules tumorales avant la coculture avec des lymphocytes. Des surnageants de 24 h sont testés par un test ELISA IFN γ (Immunotech, Marseille, France). Pour les tests

IFN γ ELISPOT, les cellules sont cocultivées avec un anticorps monoclonal anti-IFN γ présent à la surface des microplaques 96 puits. Après 24 h les plaques sont lavées et un anticorps secondaire est ajouté. Les spots sont comptés en utilisant un lecteur automatique ELISPOT (Bioreader 2000, Biosys).

5 I) Test de cytotoxicité

Des lymphocytes stimulés *in vitro* de manière hebdomadaire après trois étapes d'incubation avec une cellule autologue CD pulsée ou non avec des exosomes sont utilisés comme effecteurs. Les cellules tumorales autologues après trois à cinq passages sont marquées avec 100 μ Ci de ^{51}Cr pendant 60 mn puis lavées trois fois avant leur
 10 utilisation. Pour inhiber la lyse non spécifique, les cellules froides K562 sont ajoutées à un ratio de 50 cellules froides pour une cellule cible chaude. Pour vérifier la restriction par les CMH de classe I au cours de la reconnaissance tumorale, les anticorps W6.32 sont incubés 1 h avec les cellules tumorales marquées au ^{51}Cr avant la coculture avec les lymphocytes. Les cellules effectrices sont ajoutées aux cibles correspondantes à
 15 différents ratios cellulaires E:T. Après 4 h, 50 μ l de chaque surnageant sont récupérés et le relargage du ^{51}Cr est déterminé (compteur gamma ; Packard Top-Count, Zurich, Suisse). La moyenne des échantillons en triplicate est calculée et le pourcentage de relargage de ^{51}Cr spécifique est déterminé de la façon suivante : pourcentage de lyse
 20 spécifique = (relargage expérimental du ^{51}Cr – relargage du ^{51}Cr contrôle) / (relargage maximum du ^{51}Cr – relargage du ^{51}Cr contrôle) x 100. Le relargage expérimental du ^{51}Cr représente les coups pour les cellules cibles mélangées avec les cellules effectrices, le relargage du ^{51}Cr contrôle représente les coups des cellules cibles incubées avec un milieu seul (le relargage spontané), et le relargage du ^{51}Cr maximum représente les
 coups des cellules cibles exposées à 5 % de Triton X-100.

25

Exemple 6 : Les exosomes dérivés de cellules tumorales sont naturellement sécrétés dans les effusions pleurales ou péritonéales

Ces résultats montrent également que le procédé standard remanié décrit dans le matériel et méthodes de la demande WO 99/03499 a pu être appliqué avec succès aux
 30 effusions péritonéales pour isoler les exosomes. Comme indiqué par les études d'immunoélectronmicroscopie les culots obtenus après ultracentrifugation ont une

flottation à une densité comprise entre 1,14 et 1,18 g/ml dans un gradient de sucrose/D20 et contiennent un nombre important de vésicules membranaires ressemblant à celles décrites pour les texosomes issus de cultures de lignée cellulaire (cf. figure 1). Ces vésicules sont, pour la plupart, agrégées, de taille hétérogène (de 30 à 150 nm, comprises majoritairement entre 50 à 100 nm de diamètre, et peuvent être marquées avec un anticorps antitétraspennine CD63 et avec un anticorps monoclonal anti-CMH de classe I (cf. figure 2A). Aucune contamination significative avec des débris similaires n'a été observée dans ces préparations (cf figure 2B). Les images obtenues par western blotting révèlent les caractéristiques typiques des texosomes obtenus à partir de cultures de lignées cellulaires, en particulier, un niveau important de molécules CMH de classe I et de molécules Hsp70 et 80 comparées avec les lysats de cellules tumorales autologues recueillies à partir des fluides ascitiques ou à partir de cellules tumorales autologues de lignée cellulaire (cf. figure 2A). Comme décrit antérieurement dans la demande WO 99/03499 pour les texosomes dérivés de cultures de lignées cellulaires de mélanome *in vitro*, les texosomes purifiés à partir de deux ascites de mélanome contiennent l'antigène tumoral natif complet MART1/MelanA (cf. figure 2C). La présence de l'antigène tumoral MART1 peut être attaché aux exosomes et non pas aux débris cellulaires dans la mesure où aucune glycoprotéine gp96 ne peut être détectée dans les préparations d'exosomes à partir d'ascites. Comme antérieurement décrit pour les exosomes sécrétés à partir de cellules dendritiques murines propagées *ex vivo* (Srivastava, P.K., Methods, 12(2):165-71), les deux isoformes de lactadhérine sont surexprimées dans les exosomes dérivés d'ascites comparés aux lysats de cellules tumorales (cf. figure 2 D). Pour deux des cinq patients testés, les exosomes par opposition aux lysats de cellules tumorales extraits de cellules tumorales autologues primaires, ont des niveaux d'expression de molécules du CMH de classe II détectables par Western blots. Ceci suggère la présence d'exosomes dérivés de CPA professionnelles (cellules B, macrophages, CD) dans les ascites de ces deux patients. Les analyses quantitatives utilisant la méthode d'immunocapture avec un anticorps anti-CMH de classe I révèlent que plus de $10^{10} \pm 10^9$ molécules exosomales CMH de classe I peuvent être récupérés dans 1 ml d'ascites tumorales. L'ensemble de ces résultats démontre ainsi la faisabilité et la reproductibilité de l'isolement d'une quantité

importante d'exosomes tumoraux authentiques à partir d'ascites de patients atteints de cancer.

Les exosomes dérivés d'ascites véhiculent les antigènes de tumeur pour leur chargement dans les CD et leur présentation croisée aux lymphocytes TCD8+

5 Il a été antérieurement montré que les exosomes dérivés de lignées cellulaires de mélanome contenaient l'antigène MART1 natif et les HSP 70-80 qui pouvaient être transférés aux CD pour stimuler les CTL spécifiques MART1 restreints HLA-A2. Par conséquent, il a été testé si les exosomes purifiés à partir d'ascites d'un patient mélanome HLA-A2-, lorsqu'ils étaient chargés sur des CD-MD permettaient à de tels
10 CD de déclencher des clones CTL restreints HLA-A2 spécifiques MART1. Comme représenté à la figure 2A, au contraire d'exosomes dérivés d'ascite ovarien, les exosomes purifiés à partir d'ascite de mélanome contiennent des quantités importantes de protéine MART1 pour les deux patients testés. De manière intéressante, les CD-MD chargés avec les exosomes d'ascite extraits de patient avec un mélanome HLA-A2-, mais pas à
15 partir de patient atteint d'un cancer ovarien, induisent l'activation de CTL par exemple par la production d'IFN-gamma (cf. figure 3B). Ces résultats suggèrent que les exosomes dérivés d'ascite transfèrent leur antigène aux CD pour leur présentation croisée aux lymphocytes T CD8+ spécifiques.

20 Exemple 7 : Les CD-MD chargées avec des exosomes dérivés d'ascite induisent l'activation de CTL contre la tumeur autologue

Afin de tester la capacité des exosomes dérivés d'ascite à induire *in vitro* des réponses CTL spécifiques de tumeur, l'expérience suivante a été réalisée : des PBL d'ascite tumoraux portés par des patients atteints de cancer ont été stimulés chaque
25 semaine avec soit des cellules tumorales autologues irradiées, soit avec des CD-MD chargés avec soit des exosomes dérivés d'ascite autologue, ou avec soit des exosomes dérivés de cellules tumorales autologues. Après trois séries de stimulations *in vitro*, les PBL ont été phénotypés par analyse FACScan et comptés par la technique d'exclusion au bleu trypan avant d'être testés contre les cellules tumorales au moyen de la technique
30 de relargage en ^{51}Cr et de la sécrétion d'IFN-gamma. Ces résultats sont présentés et résumés au tableau 3 (cf. ci-après).

Tableau 3 : Les CD chargées avec des vésicules membranaires issues de fluide ascétique (Ex / As) induisent l'activation de CTL dirigées contre les cellules tumorales autologues.

Numéro du patient	Condition et nombre de stimulations	Expansion CD3/CD8 ⁺ (% de CD3/CD8 ⁺ dans la culture)	% de lyse spécifique contre les cellules tumorales autologues (E:T ratio: 50/1)	Relargage d'IFN- γ (pg/ml)			Nombre de cellules produisant de l'IFN- γ (5.10^4 cellules)		
				Pas de tumeur	Cellules tumorales	Relargage d'IFN- γ tumeur spécifique	Pas de tumeur	Cellules tumorales	Spots spécifiques de tumeur
Pt 1:	Tum Auto 3 DC / Ex As 3	1 (4 %) 10 (14 %)	0 % (± 5 %) 30 % (± 7 %)	ND	ND				
Pt 2:	DC 3 DC / Ex As 3	1 (7 %) 8 (14 %)	0 % (± 0 %) 12 % (± 0 %)	38 155	56 681	18 526			
Pt 3:	DC 3 DC / Ex As 3	7 (30 %) 8 (30 %)	30 % (± 2 %) 45 % (± 3 %)	80 40	160 1400	80 1360			
Pt 4:	DC 2 DC / Ex As 2	2 (33 %) 4 (35 %)	0 % ($\pm 0,1$ %) 5 % (± 1 %)	82 53	60 57	0 4			
Pt 5:	DC 2 DC / Ex Li 2 DC / Ex As 2	2 (23 %) 3 (28 %) 4 (30 %)	2 % (± 2 %) 6 % (± 2 %) 11 % (± 1 %)	0 144 50	0 372 256	0 228 206	0 60 70	0 150 220	0 80 150
Pt 6:	DC 3 DC / Ex Li 3 DC / Ex As 3	5 (32 %) 10 (34 %) 12 (35 %)	6 % (± 2 %) 6 % (± 2 %) 33 % ($\pm 0,4$ %)	205 75 230	340 519 1378	135 444 1148	A compter		
Pt 7:	DC 3 DC / Ex Li 3 DC / Ex As 3	3 (17 %) 5 (24 %) 5 (23 %)	0 % (± 1 %) 0 % (± 1 %) 0 % (± 2 %)	128 55 58	161 46 46	33 0 0	5 70 60	8 103 119	3 33 59

Légende du Tableau 3: Le tableau 3 résume les résultats fonctionnels obtenus avec des lymphocytes sanguins stimulés 2 ou 3 fois avec des CD chargées ou non avec des vésicules d'ascite. Pour les patients 5, 6, 7, il a été rajouté un bras testant la stimulation
 5 des lymphocytes par des CD chargées avec des exosomes de lignées cellulaires autologues provenant d'un volume liquide identique à celui des vésicules d'ascite.

La cytotoxicité est réalisée avec les lymphocytes stimulés. Les résultats présentés sont obtenus à des ratio effecteurs/cibles équivalents à 50:1, en présence de K562 froides. Les écart types sont écrits entre parenthèses. Les tests de sécrétion d'interféron- γ sont
 10 obtenus en cocultivant les lymphocytes stimulés avec ou sans cellules tumorales autologues pendant 24h. Les taux sont exprimés en pg/ml. Les taux d'interféron- γ spécifiques de la tumeur sont obtenus en soustrayant les taux d'interféron- γ sécrétés spontanément par les lymphocytes aux taux d'interféron- γ sécrétés par les lymphocytes en présence de cellules tumorales. « Tum Auto » pour tumeur autologue ; « ExAs »
 15 pour exosome dérivé d'ascite ; « ExLi » pour exosome dérivé de lignées cellulaires.

Sur l'ensemble des patients, une augmentation de cinq à douze fois du nombre absolu de cellules CD3/CD8+ a été observée après trois stimulations réalisées avec des CD chargés par des exosomes dérivés d'ascite (ExAs). Pour six des sept patients, des
 20 lymphocytes stimulés avec des CD chargés d'ExAs une augmentation de la fréquence et du « priming » de précurseur CTL a été mise en évidence. Pour cinq des patients, il a été observé que les lymphocytes stimulés avec des CD chargées en ExAs sont capables de lyser des cellules tumorales autologues et de sécréter de l'IFN-gamma après 24 h de coculture mixte lymphocyte / tumeur de manière significative, ces résultats n'ayant pas
 25 été observés pour les lymphocytes stimulés avec des CD non chargées. Ces résultats ont été confirmés par analyse ELISPOT de l'IFN-gamma énumérant de 0,3 % à 0,15 % de lymphocytes spécifiques de la tumeur après stimulation avec des CD chargés en ExAs dans les patients 5, 6 et 7. La reconnaissance des cellules tumorales autologues était spécifique de la tumeur et restreint au CMH de classe I puisque la lyse a été réalisée
 30 avec des quantités saturantes de K562 froides et complètement annulée par un anticorps anti-CMH de classe I (W6.32, cf. figure 5B). La lyse directe de K562 a été essayée pour un des patients mais aucune lyse significative n'a été obtenue (cf. figure 5A). De

manière similaire, la sécrétion d'INF-gamma par des lymphocytes stimulés *in vitro* (IVS) dirigés contre les cellules de tumeur homologue pourrait être bloquée avec succès par W6.32 (cf. figure 5B). Des résultats similaires ont été obtenus dans les tests de prolifération contre les cellules tumorales autologues pour certains patients (non montrés). La reconnaissance des cellules tumorales est spécifique de la tumeur puisque pour les patients 1 et 2, les CTL ne sont pas capables de lyser des lignées cellulaires tumorales irrelevantes et allogéniques ni non plus d'induire le relargage d'INF-gamma après coculture en présence de ces cellules irrelevantes (résultats non montrés). Au jour 0, les lymphocytes avant IVS ne présentaient aucune caractéristique de reconnaissance spécifique de tumeur. De plus, les lymphocytes stimulés avec les exosomes seuls en absence de CD ne proliféraient pas (résultats non montrés). De manière intéressante, les exosomes dérivés d'ascite apparaissent plus immunogènes que les exosomes dérivés de lignées tumorales autologues pour induire des réponses CTL *in vitro*. En effet, pour deux des trois patients testés, les niveaux spécifiques de cytotoxicité et de sécrétion d'INF-gamma obtenus en utilisant les exosomes dérivés ExAs sont significativement plus élevés que ceux obtenus en utilisant les exosomes dérivés de cellules tumorales. Les surnageants de culture et d'ascite contenant 10^6 cellules/ml ont été ultracentrifugés pour recueillir les exosomes utilisés dans l'IVS.

Par ces résultats, il a été mis en évidence de nouvelles entités antigéniques endogènes trouvées en abondance dans des ascites et effusions tumorales de patients atteints de cancer, ces entités ressemblent aux vésicules membranaires exosomales décrites pour les surnageants de culture propagés *ex vivo* montrés comme étant antigéniques et immunogéniques chez des souris porteuses de tumeurs (Raposo, G. et al., J. Exp. Med., 183(3):1161-72, 1 Mars 1996). In vivo, les exosomes pourraient être pertinents sur le plan immunologique pour des conditions physiopathologiques données puisqu'il a été mis en évidence que ces exosomes naturellement sécrétés sont bioactifs, transférant les antigènes tumoraux aux CD-DM pour activer efficacement *in vitro* les CTL des patients atteints de cancer.

Les exosomes ont été décrits comme étant des vésicules membranaires d'environ 60 à 90 nm de diamètre, issus d'endosomes multivésiculaires relargués spontanément dans le micro-environnement extracellulaire après fusion du corps multivésiculaire avec

la membrane plasmique. Sur le plan morphologique, les vésicules membranaires purifiées à partir d'ascites tumoraux ressemblent de manière typique aux exosomes dérivés de lignée cellulaire tumorale *ex vivo* par exemple par leur taille hétérogène, en forme d'hématies sur grille, et parfois agrégées, marquées fortement par des anticorps anti-CD63 et des anticorps anti-CMH de classe I par microscopie immuno-électronique. Les propriétés biophysiques comme par exemple leur flottation à une densité comprise entre 1,14 et 1,18 g/ml en gradient de sucrose est une propriété caractéristique de ces exosomes dérivés d'ascites, caractéristiques utilisées pour leur procédé de purification. Les études biochimiques révèlent les marqueurs moléculaires classiques comme ceux antérieurement reportés pour les exosomes purifiés à partir de CD-MD et de cultures de cellules tumorales. En effet, l'HSP 70 retrouvée dans les exosomes dérivés d'ascites a été préalablement décrite par l'équipe de Srivastava comme étant fortement immunogénique *in vivo* et comme étant des molécules chaperonnes constitutives surexprimées dans les endosomes tardifs et les exosomes dérivés de CD murines (Thery, C. et al., J. Cell Biol., 147:599-610, 1999) et d'exosomes dérivés de lignées cellulaires tumorales (Raposo, G. et al.). Les exosomes dérivés d'ascites présentent également une quantité importante des deux isoformes de la lactadérine, une protéine associée à la membrane ayant une affinité pour des ligands de CPA ($\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$), isoformes qui pourraient cibler les exosomes vers leurs cellules effectrices, les cellules dendritiques (Thery, C. et al.).

La détection systématique de l'antigène tumoral MART1, déjà décrite comme étant contenue dans les exosomes sécrétés de lignées cellulaires de mélanome et la détection le cas échéant de molécules de CMH classe II supportent le fait que la plupart des exosomes dérivés d'ascites sont sécrétés naturellement par les cellules tumorales plutôt que par les CPA.

Les fonctions biologiques des exosomes et leur relevance restent peu détaillées. Dans les réticulocytes, la sécrétion des exosomes élimine des récepteurs transférines et acétylcholinestérases qui sont nécessaires dans la fonction de différenciation des globules rouges. Les exosomes dérivés de lymphocytes B portent en abondance des molécules de type tétraspannine et de CMH de classe II, et se fixent sélectivement aux CD folliculaires qui ne néosynthétisent pas de molécules de CMH classe II *in vivo*, suggérant une possible fonction de ces exosomes de lymphocytes B dans les réponses

immunes humorales (Denzler, K. et al., J. Immunol., 165(3):1259-65, 1 Août 2000).
 Récemment, il a été mis en évidence qu'à la fois les exosomes dérivés de CD et de
 cellules tumorales véhiculent et transfèrent des antigènes (complexe fonctionnel CMH
 classe I et/ou II – peptide et/ou HSP) vers les CD pour activer efficacement les cellules
 5 T in vitro ou in vivo (André, F., article soumis pour publication). En cas de signal de
 danger délivré à la périphérie (tumeur, pathogènes), les CD présentent toutes les
 caractéristiques biologiques pour être attirées chimiquement pour acquérir et traiter
 des antigènes à la périphérie et de migrer vers les aires riches en cellule T des ganglions
 afin d'activer les cellules T naïves (Banchereau, J. et al., Nature, 392:245-52, 1998).
 10 Cependant, les mécanismes moléculaires ou les voies cellulaires appliquées dans le
 transfert des antigènes tumoraux vers les CD restent inconnus. Il a été montré *in vitro* de
 manière évidente que les corps apoptotiques (Albert, M.L. et al., Nature, 392:86-9,
 1998), les complexes immuns (Regnault, A. et al., J. Exp. Med., 189:371-80, 1999) les
 ARNm (Nair, S.K. et al., Nat. Med., 6(9):1011-7, Septembre 2000), l'HSP (Singh-
 15 Jasuja, H. et al., J. Exp. Med., 191(11):1965-74, 5 Juin 2000) et les exosomes dérivés de
 tumeurs (Raposo, G. et al.) participent au transfert d'antigènes des cellules périphériques
 vers les CD. Néanmoins, le transfert d'antigènes permettant la présentation croisée
 restreint CMH de classe I n'a jamais été décrit à partir de matériaux biologiques purifiés
 directement d'échantillons prélevés *in vivo*. Ici ces résultats montrent à partir d'un
 20 modèle d'antigène tumoral MART1 que les exosomes dérivés d'ascites portant un
 haplotype HLA non relevant peuvent induire l'activation de clone CTL une fois chargés
 sur les CD portant l'allèle HLA-A2 approprié. De plus, dans un système de modèle
 autologue pour lequel les antigènes tumoraux ne sont pas caractérisés (cancer des
 ovaires, du poumon ou du rein), les CD chargés avec des exosomes dérivés d'ascites
 25 induisent l'activation de CTL pour six des sept patients testés. Par conséquent, il est
 concevable que le transfert antigénique puisse être médié par de tels exosomes dérivés
 de tumeur locale, supportant l'hypothèse que les exosomes pourraient être une voie
 potentielle de transfert d'antigènes du compartiment tumoral vers le réseau de CPA.

Sans tenir compte de leur intérêt *in vivo*, les exosomes dérivés d'ascites peuvent
 30 être une nouvelle stratégie pour le chargement *ex vivo* de CD permettant la présentation
 croisée d'antigènes restreints CMH de classes I et II, particulièrement dans les modèles
 de tumeurs pour lesquelles des antigènes candidats de rejet de tumeurs sont peu

disponibles. En effet, en dépit de résultats prometteurs obtenus par les premiers essais cliniques de traitement du cancer (Nestle, F.O. et al., Nat. Med., 4:328-32, 1998 ; Murphy, G.P. et al., Prostate, 39:54-9, 1999 ; Hsu, F.J. et al., Nat. Med., 2(1):52-8, Janvier 1996 ; Kugler, A. et al., Nat. Med., 6:332-6, 2000), une stratégie optimale pour la sensibilisation de CD est requise pour les vaccins anticancéreux à large spectre. Jusqu'ici, dans les cancers des ovaires, peu d'antigènes tumoraux et de clones CTL ont été obtenus, et peu d'individus ont pu bénéficier d'immunothérapies basées sur le transfert adoptif de TIL ou de cellules LAK stimulés par l'IL-2 ou de macrophages activés (Steis, R.G. et al., J. Clin. Oncol. 8:1618-29, 1990 ; Aoki, Y. et al., Cancer Res., 51:1934-9, 1991 ; Freedman, R.S. et al., J. Immunother. Emphasis Tumo. Immunol., 16:198-210, 1994 ; Soda, H. et al., Oncol., 72:211-17, 1999). De nouveaux concepts comme la fusion de CD avec des suspensions de cellules tumorales (Gong, J. et al., J. Immunol., 165:1705-11, 2000) ou de CD chargés avec des lysats tumoraux (Santin, A.D., et al., Am. J. Obstet. Gynecol. 183:601-9, 2000) ou avec des peptides élués à l'acide (Santin, A.D. et al., Obstet. Gynecol., 96:422-30, 2000) sont en attente de l'issue d'essais cliniques. Ici, il a été montré que l'utilisation d'exosomes dérivés d'ascites pour sensibiliser des CD est une méthode applicable nouvelle et efficace puisque capable d'induire l'activation de CTL dirigée contre des cellules tumorales autologues pour six des sept patients testés, ceci en utilisant un procédé compatible avec les bonnes pratiques des laboratoires. Des résultats obtenus (non présentés) révèlent d'une part que cette stratégie peut être implémentée pour cloner de nouveaux CTL et ainsi d'isoler de nouveaux antigènes tumoraux attachés à des modèles de tumeurs rares, et d'autre part révèlent l'efficacité d'exosomes péritonéaux comme vaccin intradermique prophylactique contre l'établissement de leucémie L1210 syngénique.

25

En conclusion, ces résultats montrent que les vésicules membranaires (exosomes) isolés dérivés de fluides biologiques prélevés *in vivo*, notamment dérivés de fluides d'ascite, selon la présente invention, présentent de nombreux avantages par rapport aux texosomes isolés de lignées cellulaires décrit en particulier dans le document WO 99/03499, comme en particulier :

30

- elles sont sécrétées de manière naturelle et en plus grande quantité *in vivo* et peuvent être purifiés facilement *in vitro* ;

- la prolifération (ou amplification, ou expansion) des cellules T induite par des CD chargées par les vésicules membranaires selon la présente invention, est au moins égale ou sinon supérieure à celle induite par des CD chargées par des texosomes dérivés de lignées cellulaires;
- 5 -le pourcentage de lyse spécifique obtenu contre les cellules tumorales autologues par les cellules T stimulées (pulsées) par des CD chargées par les vésicules membranaires selon la présente invention, est en général très supérieure (2 à 5 fois plus) que celui obtenu pour des cellules effectrices pulsées par des CD chargées par des texosomes dérivés de lignées cellulaires (cf tableau 3);
- 10 - les molécules du CMH portées par les vésicules membranaires selon la présente invention sont en nombre très supérieures à celles portées par des texosomes dérivés de lignées cellulaires. Le plus grand pouvoir immunogène des vésicules membranaires selon la présente invention est particulièrement mis en évidence pour le patient 6 (cf tableau 3) ;
- 15 - les vésicules membranaires selon la présente invention sécrètent en plus grand nombre des molécules de ciblage, notamment les isoformes de la lactadhérine ou des IgG, que les texosomes dérivés de lignées cellulaires; et
 - les vésicules membranaires selon la présente invention possèdent un répertoire antigénique plus représentatif du répertoire de la population initiale de cellules du fluide
 - 20 dont elles sont issues que les texosomes issus de lignée cellulaires. Il a ainsi déjà été mis en évidence que la réponse immune de type cytotoxique spécifique de tumeur, obtenue en utilisant des lignées cellulaires tumorales ne reflétait pas totalement l'activité antitumorale exercée *in vivo* par la tumeur (Dufour et al., J. of Immunol., 158 (8), 3787-95, 1997).
 - 25 Les vésicules membranaires selon la présente invention, notamment celles isolées à partir de fluide d'ascite, peuvent de ce fait et de manière avantageuse être utilisées à des fins thérapeutiques ou diagnostics, en particulier comme vaccin autologue ou allogénique, mais aussi comme méthode de chargement des cellules dendritiques à visée thérapeutique.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation *in vitro* de vésicules membranaires isolées de leur environnement naturel à partir d'un échantillon préalablement prélevé *in vivo* d'un échantillon chez un mammifère, notamment chez l'homme, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape suivante :
 - a) l'isolement *in vitro* desdits vésicules membranaires à partir dudit échantillon prélevé, ledit échantillon étant un échantillon d'un fluide biologique susceptible de contenir en suspension des vésicules membranaires.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon choisi parmi les fluides biologiques suivants : un fluide abdominal, un fluide péritonéal, un fluide pleural, un fluide céphalorachidien, du sang total, de l'urine ou tout fluide, effusion ou épanchement émanant d'une cavité dudit mammifère.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon de fluide exsudatif ou transsudatif.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon de fluide exsudatif ou transsudatif prélevé dans une cavité et résultant d'un cancer, d'une réaction inflammatoire, d'une transplantation, ou d'un transfert de gène ou d'une substance chimique.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est un échantillon de fluide d'ascite.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est un échantillon de fluide d'ascite tumoral de patients atteints d'un cancer.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'isolement des vésicules membranaires est effectué par centrifugation, électrophorèse, chromatographie, nanofiltration et/ou par immunocapture.
8. Vésicules membranaires isolées de leur environnement naturel susceptibles d'être obtenues par un procédé selon l'une des revendications 1 à 7.
9. Vésicules membranaires selon la revendication 8, caractérisées en ce qu'elles contiennent en majorité des vésicules membranaires de diamètre compris entre 30 et 150 nm, de préférence entre 50 et 100 nm et entre 60 et 90 nm.

10. Vésicules membranaires selon la revendication 8 ou 9, caractérisées en ce que lesdites vésicules membranaires portent des molécules impliquées dans la présentation d'antigènes, notamment des molécules du CMH de classe I et/ou II, et/ou des HSP et/ou des antigènes, notamment tumoraux, et/ou des molécules impliquées dans le ciblage d'antigène.

11. Vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisées en ce qu'elles ne contiennent pas de glycoprotéine gp96.

12. Utilisation de vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11 pour le chargement et/ou l'activation *in vitro* de cellules présentatrices d'antigènes, notamment de cellules dendritiques.

13. Utilisation de vésicules membranaires selon la revendication 12, caractérisée en ce que lesdites vésicules membranaires et lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont autologues ou syngéniques.

14. Utilisation de vésicules membranaires selon la revendication 12, caractérisée en ce que lesdites vésicules membranaires et lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont allogéniques.

15. Utilisation de vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11 pour la stimulation *in vitro* et, le cas échéant, l'amplification ou l'anergisation *in vitro* de lymphocytes T, ou encore pour la stimulation *in vitro* et, le cas échéant, l'amplification *in vitro* de cellules NK ou NKT spécifiques d'antigènes contenus dans lesdites vésicules membranaires.

16. Utilisation de vésicules membranaires selon la revendication 15, caractérisée en ce que lesdites vésicules membranaires et lesdits lymphocytes T ou cellules NK ou NKT sont autologues ou syngéniques.

17. Utilisation d'une suspension de vésicules membranaires selon la revendication 15, caractérisée en ce que lesdites vésicules membranaires et lesdits lymphocytes T ou cellules NK ou NKT sont allogéniques.

18. Procédé de préparation *in vitro* de cellules présentatrices d'antigènes chargées en vésicules membranaires, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) l'incubation *in vitro* de cellules présentatrices d'antigènes en présence de vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11 ; et

b) la récupération desdites cellules présentatrices d'antigènes chargées en vésicules membranaires ainsi obtenues.

19. Procédé de préparation de cellules présentatrices d'antigènes selon la revendication 18, caractérisé en ce que les cellules présentatrices d'antigènes à l'étape a) sont des cellules dendritiques, notamment immatures.

20. Procédé de préparation de cellules présentatrices d'antigènes selon la revendication 18, caractérisé en ce que les cellules présentatrices d'antigènes à l'étape a) sont des cellules dendritiques obtenues à partir de précurseurs monocytes ou de moelle osseuse.

21. Procédé de préparation de cellules présentatrices d'antigènes selon la revendication 18, caractérisé en ce que les cellules présentatrices d'antigènes à l'étape a) sont des cellules dendritiques issues de cellules dendritiques immortalisées.

22. Procédé de préparation de cellules présentatrices d'antigènes selon l'une des revendications 18 à 21, caractérisé en ce que lesdites vésicules membranaires et lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont autologues ou syngéniques.

23. Procédé de préparation de cellules présentatrices d'antigènes selon l'une des revendications 18 à 21, caractérisé en ce que lesdites vésicules membranaires et lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont allogéniques.

24. Cellule présentatrice d'antigènes chargée en vésicules membranaires susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des revendications 18 à 23.

25. Dexosomes isolés, sécrétés par des cellules présentatrices d'antigènes selon la revendication 24.

26. Procédé de préparation *in vitro* de lymphocytes T, cellules NK ou NKT activés ou de lymphocytes T anergiques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) l'incubation *in vitro* de lymphocytes T, cellules NK ou NKT en présence de cellules présentatrices d'antigènes chargées en vésicules membranaires selon la revendication 24 ou dexosomes selon la revendication 25 ; et

b) la récupération desdits lymphocytes T, cellules NK ou NKT ainsi activés ou desdits lymphocytes T anergiques.

27. Procédé de préparation *in vitro* de lymphocytes T, cellules NK ou NKT selon la revendication 26, caractérisé en ce que les cellules présentatrices d'antigènes,

ou leurs dexosomes, et lesdits lymphocytes T, ou cellules NK ou NKT, sont autologues ou syngéniques.

28. Lymphocytes T, cellules NK ou NKT susceptibles d'être obtenus par le procédé selon la revendication 26 ou 27.

5 29. Utilisation de vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11, de cellules présentatrices d'antigènes selon la revendication 24, de dexosomes selon la revendication 25, ou de lymphocytes T selon la revendication 28, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée chez un patient et à induire ou à augmenter une réponse immune de type CTL spécifique d'antigènes
10 contenus dans lesdites vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11 et dans laquelle utilisation, lesdites vésicules membranaires, cellules présentatrices d'antigènes et lymphocytes T sont autologues ou syngéniques du patient à traiter.

 30. Utilisation de vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11, de cellules présentatrices d'antigènes selon la revendication 24, de dexosomes selon
15 la revendication 25, ou de cellules NK ou NKT selon la revendication 28, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée chez un patient et à induire ou à augmenter une réponse innée de type NK ou NKT spécifique d'antigènes contenus dans lesdites vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11 et dans laquelle utilisation, lesdites vésicules membranaires,
20 cellules présentatrices d'antigènes et cellules NK ou NKT sont autologues ou syngéniques du patient à traiter.

 31. Utilisation selon la revendication 29 ou 30, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou au traitement de patient atteint d'un cancer.

25 32. Utilisation de cellules présentatrices d'antigènes, notamment de cellules dendritiques, prélevées chez un premier patient (le receveur) ou chez un patient dont ses cellules présentatrices d'antigènes sont syngéniques aux cellules présentatrices d'antigènes du premier patient, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée chez ce premier patient, caractérisée en ce que lesdites
30 cellules présentatrices d'antigènes ont été préalablement chargées *in vitro* avec des vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11 isolées à partir d'un fluide

biologique prélevé chez un deuxième patient (le donneur), ledit receveur et donneur étant allogéniques.

33. Utilisation de lymphocytes T prélevées chez un premier patient (le receveur) ou chez un patient dont ses lymphocytes T sont syngéniques au lymphocytes T du premier patient pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée chez ce premier patient, caractérisée en ce que lesdits lymphocytes T ont été préalablement activés *in vivo* avec des cellules présentatrices d'antigènes préalablement chargées avec des vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11, lesdites vésicules membranaires ayant été isolées à partir d'un fluide biologique prélevé chez un deuxième patient (le donneur), ledit receveur et donneur étant allogéniques.

34. Utilisation de cellules présentatrices d'antigènes selon la revendication 32 ou de lymphocytes T selon la revendication 33, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à induire la tolérance par ledit receveur d'un greffon allogénique prélevé chez ledit donneur.

35. Utilisation de cellules présentatrices d'antigènes selon la revendication 34 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à induire la tolérance par ledit receveur d'un greffon allogénique prélevé chez ledit donneur par la méthode dite de « transfert adoptif de cellules dendritiques du receveur préalablement chargées *in vitro* par des vésicules membranaires du donneur ».

36. Utilisation de lymphocytes T selon la revendication 34 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à induire la tolérance par ledit receveur d'un greffon allogénique prélevé chez ledit donneur par la méthode dite de « transfert adoptif de lymphocytes T du receveur préalablement activés *in vivo* par des cellules dendritiques du receveur préalablement chargées (pulsées) par des vésicules membranaires du donneur ».

37. Utilisation de vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11, de cellules présentatrices d'antigènes selon la revendication 24 ou de dexosomes selon la revendication 25, pour la sélection *ex vivo* d'un répertoire de lymphocytes T, susceptibles de reconnaître des antigènes spécifiques contenus dans lesdites vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11.

38. Médicament comprenant à titre de substance active une ou plusieurs vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11, cellules présentatrices d'antigènes selon la revendication 24, de dexosomes selon la revendication 25 ou des lymphocytes T, cellules NK ou NKT selon la revendication 28, en association avec un
5 véhicule pharmaceutiquement acceptable.

39. Médicament selon la revendication 38 pour le traitement des cancers.

40. Médicament selon la revendication 38 ou 39, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un adjuvant immunostimulant synthétique ou naturel.

41. Procédé de diagnostic *in vitro* d'un cancer et/ou de son évolution chez un
10 patient, caractérisé en ce qu'on détermine la présence de marqueurs ou précurseurs spécifiques d'un cancer et/ou de son évolution à la surface et/ou dans le cytosol de vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11.

42. Procédé de diagnostic *in vitro* selon la revendication 41, caractérisé en ce que les vésicules membranaires issues d'un fluide biologique prélevé chez le patient,
15 sont issues d'un fluide d'ascite ou d'une effusion, notamment émanant d'une cavité, telle qu'une cavité péritonéale, abdominale ou pleurale.

43. Procédé de diagnostic *in vitro* selon la revendication 41 ou 42, caractérisé en ce que la détermination de la présence de marqueurs ou précurseurs spécifiques d'un cancer et/ou de son évolution est réalisée par une technique immunoenzymatique de
20 type ELISA, Western Blot, immunocapture ou immunoélicspot à l'aide d'anticorps spécifiques de ces marqueurs.

44. Utilisation de vésicules membranaires (texosomes) dérivant d'échantillon de fluide d'ascite tumoral selon l'une des revendications 8 à 11, de CPA, notamment de cellules dendritiques, selon la revendication 24, pour la fabrication d'un test
25 d'hypersensibilité retardé du cancer.

45. Utilisation de vésicules membranaires (texosomes) dérivant d'échantillon de fluide d'ascite tumoral selon l'une des revendications 8 à 11, de CPA, notamment de cellules dendritiques, selon la revendication 24, comme outil de diagnostic de recherche de fréquence de précurseurs spécifiques CTL.

30 46. Procédé de préparation *in vitro* d'une banque d'anticorps d'origine murine dirigés contre des antigènes humains portés par des vésicules membranaires selon l'une des revendications 8 à 11, notamment tumoraux, à partir d'un échantillon

préalablement prélevé *in vivo* chez une souris SCID, notamment SCID/NOD, d'un échantillon de fluide d'ascite péritonéal résultant de l'implantation par voie intrapéritonéale d'une tumeur, d'un tissu ou de cellules tumorales humaines, ledit prélèvement contenant ladite banque d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend

5 l'étape suivante :

a) la purification des anticorps contenus dans ledit prélèvement.

47. Procédé de préparation *in vitro* d'une banque de texosomes isolés d'origine murine et humaine à partir d'un échantillon préalablement prélevé *in vivo* chez une souris SCID d'un échantillon de fluide d'ascite péritonéal résultant de l'implantation
10 par voie intrapéritonéale d'une tumeur, d'un tissu ou de cellules tumorales humaines, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape suivante :

a) l'isolement *in vitro* desdits texosomes à partir dudit échantillon prélevé par centrifugation, électrophorèse, chromatographie, nanofiltration et/ou par immunocapture.

15 48. Procédé de préparation de texosomes modifiés *in vitro*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) l'isolement *in vitro* de vésicules membranaires (texosomes) à partir d'un échantillon de fluide d'ascite tumoral par un procédé selon l'une des revendications 1 à 7 ;

b) l'élution, notamment acide, desdits texosomes naturels obtenus à l'étape a) ;

20 c) la mise en contact desdits texosomes naturels élués avec des peptides, glycolipides ou phospholipides d'intérêt que l'on désire charger dans les texosomes ; et

d) la récupération desdits texosomes ainsi modifiés.



100 nm

Fig. 1

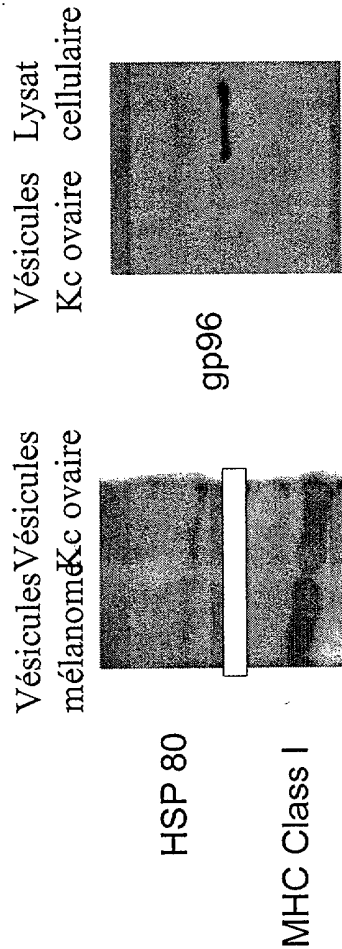


Fig. 2B

Fig. 2A

Fig. 2

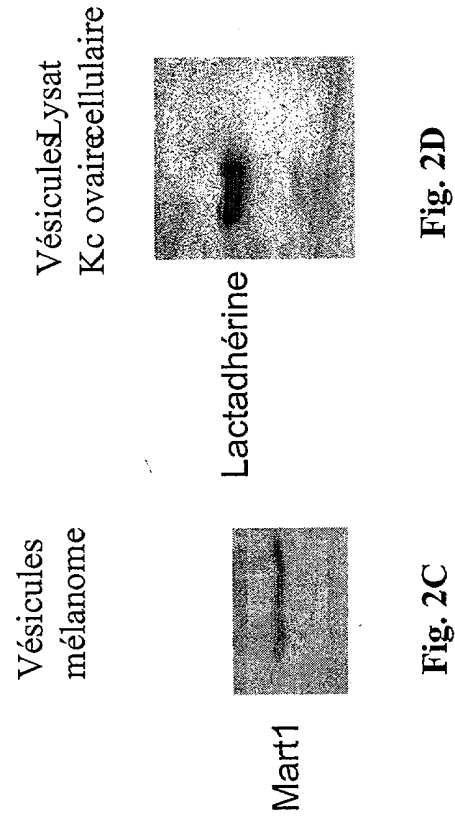
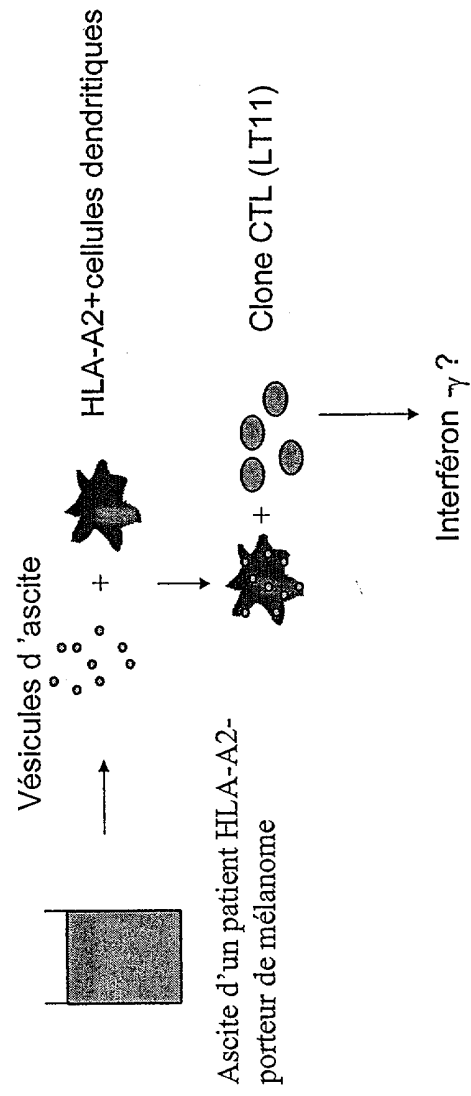


Fig. 2 (suite)

**Fig. 3. A.**

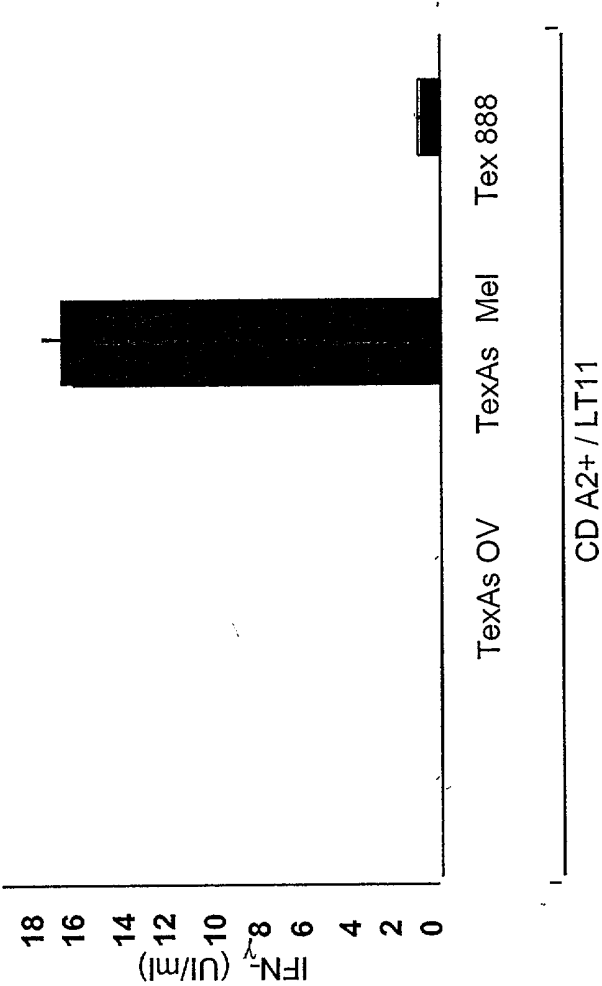
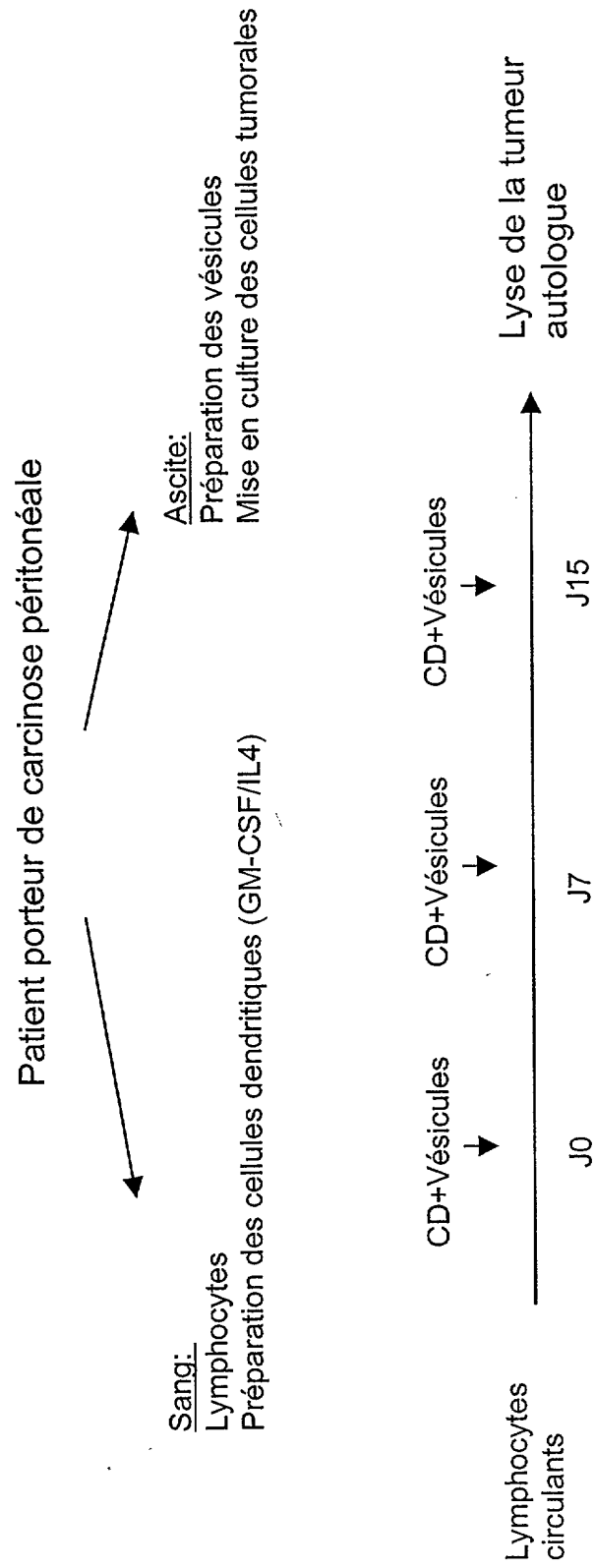
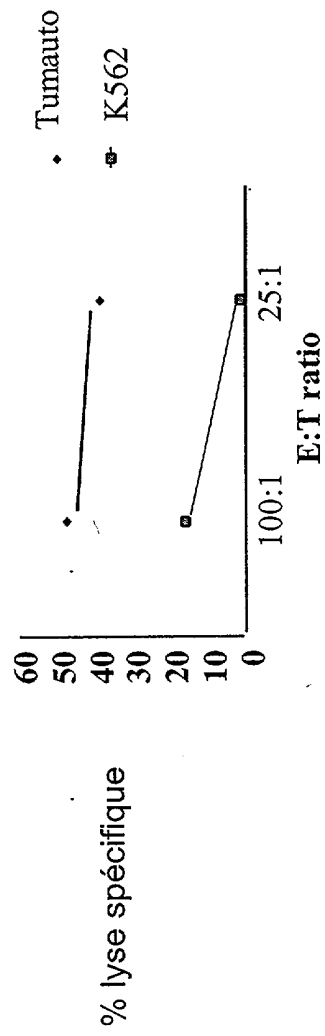


Fig. 3. B.

**Fig. 4**

**Fig. 5.A**

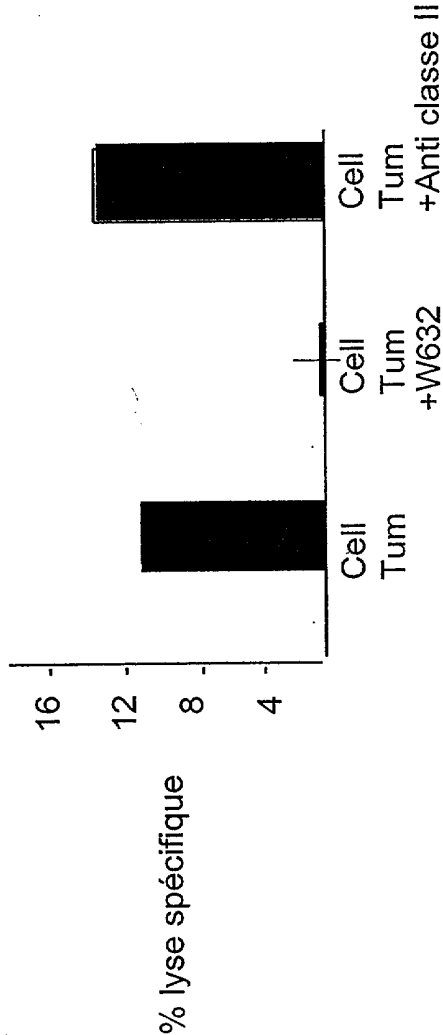
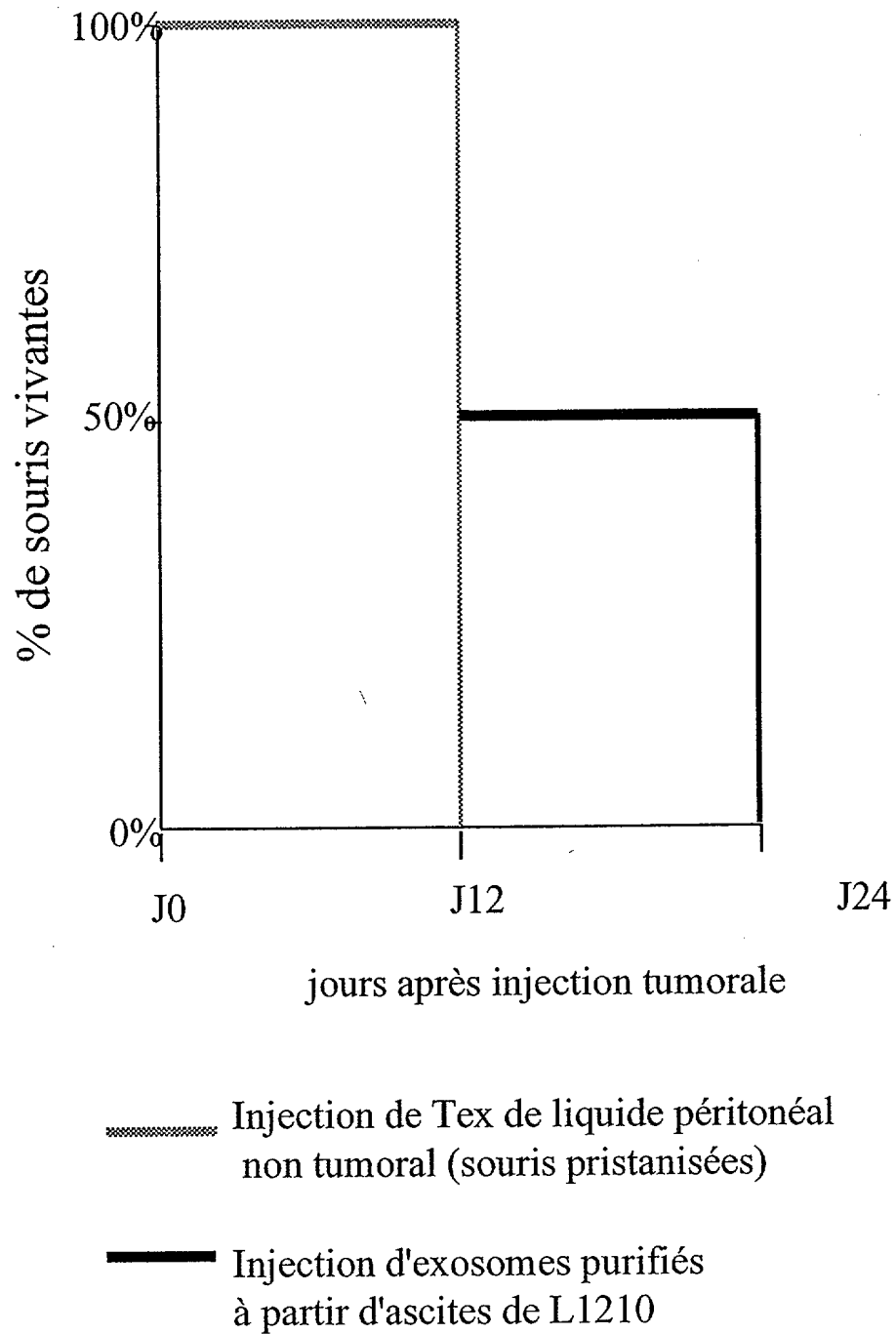


Fig. 5.B

**Fig. 6**

Conditions de
stimulation

CD/ExAs

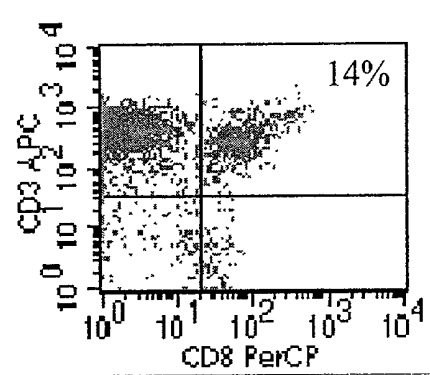


Fig. 7a

Cellules tumorales
autologues irradiées

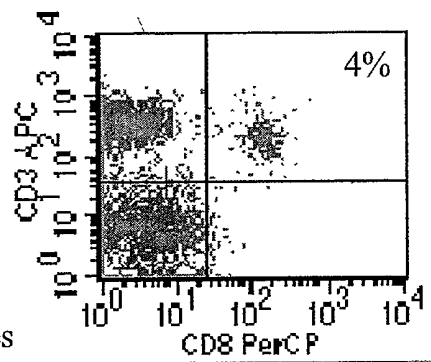


Fig. 7B

Fig. 7

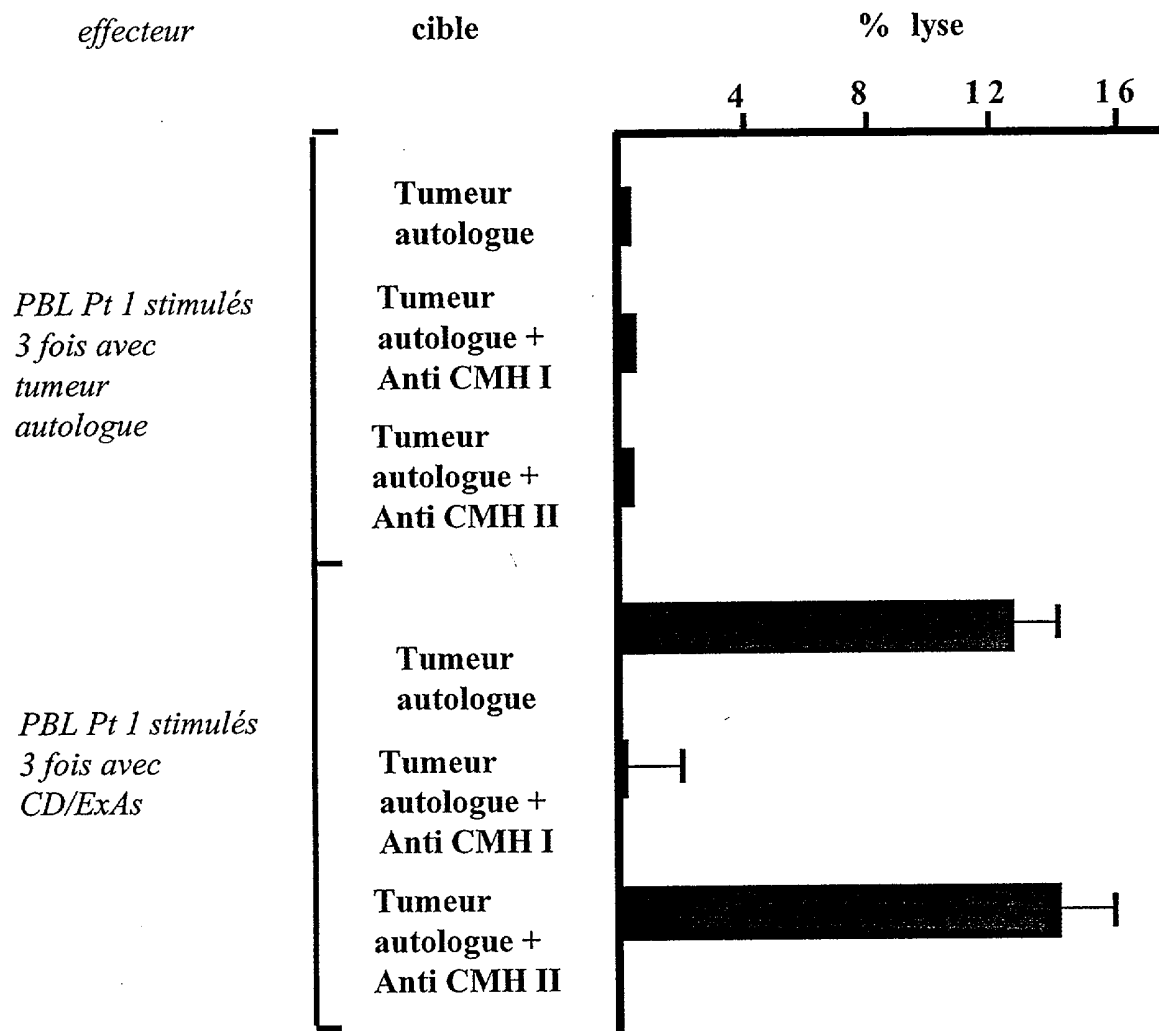


Fig. 7c

Fig. 7 (suite)

Conditions
de stimulation

CD / ExAs

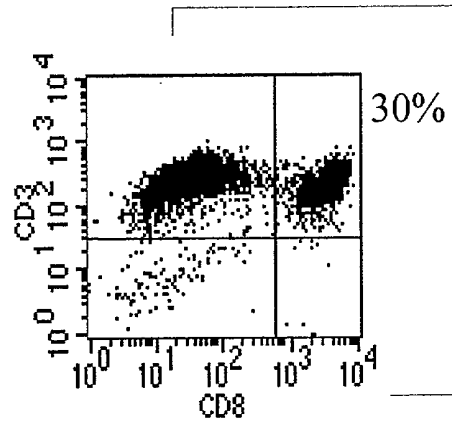


Fig. 8A

CD

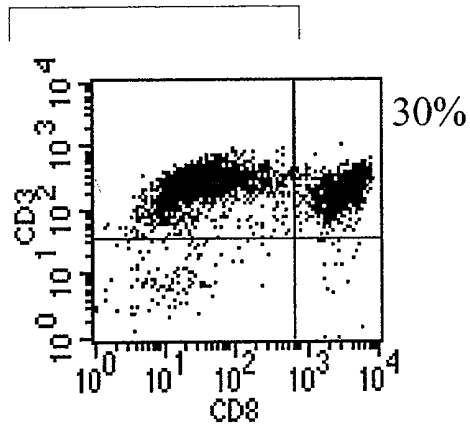


Fig. 8B

Fig. 8

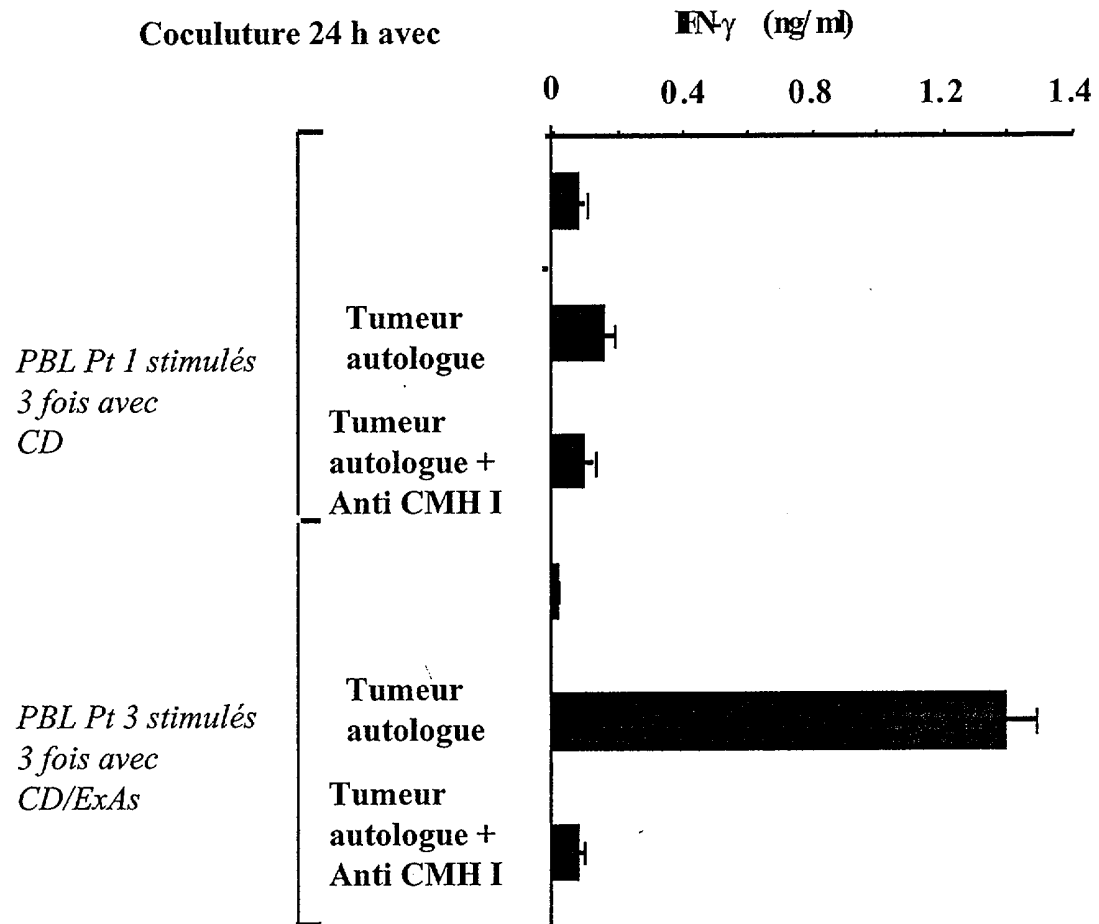


Fig. 8C

Fig. 8 (suite)

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 611579
FR 0110179

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	ANDRE F ET AL: "Tumor-derived exosomes as a novel source of shared tumor rejection antigens." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 42, mars 2001 (2001-03), page 276 XP002202775 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; New Orleans, LA, USA; 24-28 March 2001 ISSN: 0197-016X Abstract 1484 ---	1-48	C12N5/08 A61K35/12 A61K39/00 A61P35/00 A61P37/06 G01N33/53
D,X	WO 99 03499 A (AMIGORENA SEBASTIAN ;INST NAT SANTE RECH MED (FR); ROUSSY INST GUS) 28 janvier 1999 (1999-01-28) * le document en entier *	8-40, 46-48	
D,X	WOLFERS JOSEPH ET AL: "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming." NATURE MEDICINE, vol. 7, no. 3, mars 2001 (2001-03), pages 297-303, XP002202776 ISSN: 1078-8956 * le document en entier *	8-40, 46-48	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) A61K C12N G01N
D,X	ZITVOGEL L ET AL: "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes" NATURE MEDICINE, vol. 4, no. 5, 1 mai 1998 (1998-05-01), pages 594-600, XP002085387 ISSN: 1078-8956 * le document en entier *	8-40, 46-48	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
19 juin 2002		Teyssier, B	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS 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 bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 611579
FR 0110179

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 97 05900 A (MELIEF CORNELIS J M ;UNIV LEIDEN (NL); UNIV UTRECHT (NL); GEUZE JO) 20 février 1997 (1997-02-20) * le document en entier *	8-40, 46-48	
X	RAPOSO G ET AL: "B Lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 183, 1996, pages 1161-1172, XP002060486 ISSN: 0022-1007 * le document en entier *	8-40, 46-48	
A,D	DENZER K ET AL: "Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 165, no. 3, 1 août 2000 (2000-08-01), pages 1259-1265, XP002202777 ISSN: 0022-1767		
A,D	THERY C ET AL: "Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 147, no. 3, 1 novembre 1999 (1999-11-01), pages 599-610, XP000918507 ISSN: 0021-9525		
A	WO 99 58645 A (BARTHOLEYNS JACQUES ;IDM IMMUNO DESIGNED MOLECULES (FR); GREGOIRE) 18 novembre 1999 (1999-11-18)		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
19 juin 2002		Teyssier, B	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS 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 bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0110179 FA 611579**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **19-06-2002**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9903499	A	28-01-1999	FR 2766205 A1	22-01-1999
			FR 2774697 A1	13-08-1999
			AU 743296 B2	24-01-2002
			AU 8446498 A	10-02-1999
			CN 1265038 T	30-08-2000
			EP 1001806 A1	24-05-2000
			WO 9903499 A1	28-01-1999
			JP 2000512161 T	19-09-2000
WO 9705900	A	20-02-1997	AU 6632496 A	05-03-1997
			CA 2225553 A1	20-02-1997
			EP 0841945 A1	20-05-1998
			JP 11510507 T	14-09-1999
			WO 9705900 A1	20-02-1997
WO 9958645	A	18-11-1999	AU 4139899 A	29-11-1999
			CA 2331115 A1	18-11-1999
			WO 9958645 A1	18-11-1999
			EP 1078043 A1	28-02-2001